

Aspekte der Angiogenese durch Angiogenin
PDF-Version



Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach

Herzchirurgie

vorgelegt dem Rat
der Medizinischen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Herrn Dr. med. Horst R. LAUBE

geboren am 05.07.1952 in Frankfurt am Main

Präsidentin: Prof. Dr. Marlis Dürkop

Dekan: Prof. Dr. Harald Mau

Eingereicht: Berlin, den 15. Januar 1995

- Gutachter: 1. Prof. Dr. Wolfgang Konertz
Klinik und Poliklinik f. Herzchirurgie, Universitätsklinikum Charité
2. Prof. Dr. K.-L. Schulte
Klinik f. Innere Medizin, Abtlg. Angiologie, Universitätsklinikum Charité
3. Prof. Dr. Hermann Haller
Klinik f. Innere Medizin, Abtlg. Nephrologie/Humangenetik, Franz-Volhard-Klinik Berlin-Buch

Datum der Habilitation: Berlin, den 18. März 1996

Abstract

The growth of new vessels is called angiogenesis. Special growth factors e.g. basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) are potent stimulators of angiogenesis in vivo and in vitro.

Angiogenin another angiogenic protein was isolated first by Fett et al. 1985 from human carcinoma cells.

- Part I: The effect of angiogenin to stimulate angiogenesis in ischemic hind legs of inbred male Lewis rats is described. In this new animal model ischemia was induced by the ligation of the femoral artery. To stimulate angiogenesis angiogenic proteins (bFGF, angiogenin) were locally applied and compared to untreated ischemic animals. Already 1.9 ng locally applied angiogenin significantly stimulated the growth of collaterals in ischemic rat hind legs which could be demonstrated already 7 days after the application of angiogenin. The best stimulation of angiogenesis was achieved by the local application of 100 ng angiogenin which was 2.5-fold more angiogenic than 250 ng bFGF in the ischemic rat legs. The angiogenic effect of angiogenin as well as of bFGF was dependent on the applied dose reaching an optimum concerning angiogenin between 10 and 100 ng and for bFGF at 250 ng.
- Part II: The patency of PTFE vascular grafts with different angiogenic luminal coatings was tested in an animal model. In White New Zealand rabbits the abdominal aorta was replaced by a 5 cm long PTFE vascular graft 2 mm in diameter. Angiogenin and bFGF luminal coated PTFE grafts were 24 hours patent. Angiogenin coated grafts were after 8 hours occluded by a small distal thrombus. bFGF coated grafts were occluded after 6 hours. Heparine coated grafts were totally occluded by a thrombus after only 2 hours and gelatine coated grafts were already occluded after 1 hour.
- Part III: Protein Kinase C (PKC) isolated from rat brain was able to phosphorylate angiogenin with an efficiency reaching 49% using Ca^{2+} , Phospholipids and Dioleins as stimulators of the reaction. Histone V S was phosphorylated to 50% and bFGF to 84% by the same PKC. The determined Michaelis-Menten-Factor was concerning angiogenin $k_m = 50 \mu\text{M}$, bFGF $k_m = 3.3 \mu\text{M}$ and Histone V S $k_m = 10 \mu\text{M}$. The separation of phosphorylated angiogenin was possible with the method of Sephadex G25 molecular sieve centrifugation as well as with the Centricon 10 membrane centrifugation.

The presented results demonstrate that angiogenin is a potent angiogenic protein stimulating the formation of new collaterals which was quantitatively evaluated in a new standardized rat animal model. The stimulation of indirect revascularization by angiogenin may be of therapeutical value in the treatment of ischemic cardio-vascular diseases.

The patency of PTFE vascular prostheses 2 mm in diameter can successfully be tested in an animal model in White New Zealand rabbits by replacing the abdominal aorta by a 5 cm long PTFE vascular graft. Testing variant angiogenic luminal coatings of these PTFE grafts showed that a combination of bFGF/angiogenin had the best patency.

Phosphorylation of angiogenin with PKC in vitro was possible reaching an efficiency of 49% by using the stimulators Ca^{2+} , Phospholipids and Dioleins for the reaction. Phosphorylated angiogenin may be a valuable modified angiogenic protein to study its biological and angiogenic activity in vivo and in vitro and could be helpful in the evaluation of its cellular pathways and receptors.

Keywords:

Bio-technology - Tissue-engineering - Angiogenesis - Growth factors

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. GLOSSAR.....	1
1.1 Abkürzungen.....	1
1.2 Definitionen.....	3
1.3 Formeln	4
2. EINLEITUNG.....	6
2.1 Bedeutung und bisherige Behandlungskonzepte vaskulärer Erkrankungen.....	6
2.2 Wegweisende Erkenntnisse und Techniken zur Untersuchung der Angiogenese in vitro und in vivo	8
2.3 Struktur der Arbeit.....	10
3. FRAGESTELLUNG.....	12
4. SEKTION I:	
Quantitative Untersuchung zur Stimulierung der indirekten Revaskularisie- rung ischämischer Gewebe durch Wachstumsfaktoren im standardisierten Tiermodell an der Ratte.....	14
4.1 Vorbemerkungen	14
4.2 Tiermodell	15
4.3 Untersuchung der Langzeiteffekte von Angiogenin.....	16
4.3.1 Material und Methoden	16
4.3.1.1 Beschichtung von Poly-Tetra-Fluor-Äthylen (PTFE) mit Collagen I und Angiogenin.....	16
4.3.1.2 Messung der Angiogeninbindung an PTFE.....	16

4.3.1.3 Tierversuch.....	19
4.3.1.4 Auswertung.....	20
4.3.2 Ergebnisse.....	22
4.3.3 Diskussion.....	25
4.4 Untersuchung der Dosis-Wirkungsbeziehung von Angiogenin und basischem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF).....	28
4.4.1 Material und Methoden	28
4.4.1.1 Applikation von Angiogenin/bFGF an PTFE.....	28
4.4.1.2 Tierversuch.....	29
4.4.1.3 Auswertung.....	29
4.4.2 Ergebnisse.....	30
4.4.3 Diskussion.....	33
4.5 Zusammenfassung.....	37
 5. SEKTION II:	
 Tiermodell zur Testung der Offenheitsrate von kleinlumigen (Ø2mm) Gefäß-Prothesen mit angiogenetischer Beschichtung.....	
5.1 Vorbemerkungen	38
5.2 Tiermodell	39
5.3 Methodik	40
5.3.1 Prothesenbeschichtung mit angiogenetischen Faktoren.....	40
5.3.2 Tierversuch	41
5.3.3 Auswertung.....	42
5.4 Ergebnisse	43
5.5 Diskussion.....	43
5.6 Zusammenfassung.....	46

6. SEKTION III:

Phosphorylierung von Angiogenin, basischem Fibroblasten Wachstumsfaktor (bFGF) und Histon V S durch Proteinkinase C (PKC) in vitro	47
6.1 Vorbemerkungen	47
6.2 Isolierung und Reinigung der PKC	48
6.3 Methodik	48
6.3.1 Phosphorylierungsreaktion	48
6.3.2 C18-HPLC	49
6.3.3 Mono S-HPLC	49
6.3.4 Saure Proteinfällung	49
6.3.5 SEPHADEX G25 Molekularsiebsäulenzentrifugation	49
6.3.6 CENTRICON 10 Membranfilterzentrifugation	49
6.3.7 SDS-PAGE	50
6.3.8 Messung des ^{32}P -Einbaus	50
6.3.9 Berechnung der aktuellen ^{32}P -Aktivität	50
6.4 Ergebnisse	50
6.4.1 Reinigungsschritte PKC-phosphorylierter Proteine	50
6.4.2 C18-HPLC und Mono S-HPLC phosphorylierten Angiogenins	51
6.4.3 SDS-Gelelektrophorese PKC-phosphorylierter Proteine	52
6.4.4 Saure Proteinfällung PKC-phosphorylierter Proteine	55
6.4.5 SEPHADEX G25 Molekularsiebsäulenzentrifugation PKC-phosphorylierter Proteine	55
6.4.6 CENTRICON 10 Membranfilterzentrifugation PKC-phosphorylierter Proteine	55
6.4.7 Optimierung der Phosphorylierungsreaktion	56
6.4.7.1 Zeitkinetik der Histon-Phosphorylierung durch PKC	56
6.4.7.2 Bestimmung der Michaelis-Konstante	57
6.4.7.3 Berechnung der spezifischen Aktivität der PKC	58
6.4.7.4 Pufferspezifität der Proteinphosphorylierung durch PKC	58
6.5 Diskussion	59

6.6 Zusammenfassung	61
7. ZUSAMMENFASSUNG	62
8. LITERATURVERZEICHNIS	66
9. ANHANG 1:	
VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN	83
10. ANHANG 2:	
DETAILLIERTE AUFLISTUNG VON MATERIAL UND METHODEN ZUR PHOSPHORYLIERUNG VON PROTEINEN DURCH PKC	128
10.1 Phosphorylierungsreaktion	128
10.1.1 Materialien	128
10.1.2 Reagenzien	129
10.1.3 Ausführung	131
10.2 C18-HPLC	131
10.2.1 Materialien	131
10.2.2 Reagenzien	131
10.2.3 Ausführung	132
10.3 Mono S-HPLC	132
10.3.1 Materialien	132
10.3.2 Reagenzien	132
10.3.3 Ausführung	132
10.4 Saure Proteinfällung	133
10.4.1 Materialien	133

10.4.2 Ausführung	133
10.5 SEPHADEX G25 Molekularsiebsäulenzentrifugation.....	133
10.5.1 Materialien	133
10.5.2 Ausführung	133
10.6 CENTRICON 10 Membranfilterzentrifugation.....	134
10.6.1 Materialien	134
10.6.2 Reagenzien.....	134
10.6.3 Ausführung	134
10.7 SDS-PAGE	135
10.7.1 Materialien und Reagenzien.....	135
10.7.2 Arbeitslösungen.....	136
10.7.3 Ausführung	137
10.8 Messung des ³²P-Einbaus.....	138
10.9 Berechnung der aktuellen ³²P-Aktivität.....	138
11. ANMERKUNGEN UND DANKSAGUNG	140
12. CURRICULUM VITAE.....	141

1. GLOSSAR

1.1. Abkürzungen

ADP	-	Adenosindiphosphat
aFGF	-	saurer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (acidic Fibroblast Growth Factor)
ANG	-	Angiogenin
ATP	-	Adenosintriphosphat
bFGF	-	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (basic Fibroblast Growth Factor)
BHK	-	Baby Hamster Nieren (Kidney)
β-ME	-	β-Mercapto-Äthanol
cAMP	-	zyklisches Adenosinmonophosphat
CaM PK	-	Kalzium/Kalmodulin-abhängige Proteinkinase
CAM-Assay	-	Hühner-Allantois-Membran-Test (Chicken Allantois Membrane Assay)
CaCl ₂	-	Kalziumchlorid
Da	-	Dalton
DTT	-	Dithiothreitol
EDTA	-	Äthylendiamintetraessigsäure
EGF	-	Epidermal Growth Factor
EGTA	-	Äthylenglykol-bis(β-aminoäthyläther)N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ePTFE	-	gestrecktes Poly-Tetra-Fluor-Äthylen (expanded Poly Tetra Fluor Ethylene)
FG	-	Formelgewicht
FGF	-	Fibroblast Growth Factor
(γ- ³² P)ATP	-	In gamma-Position mit radioaktivem Phosphor-32 markiertes ATP
hANG	-	humanes Angiogenin

HBSS	-	Hanks balanced salt solution
HCl	-	Salzsäure
hFGF	-	humaner Fibroblasten-Wachstumsfaktor
Hepes	-	N-(2-Hydroxyäthyl)-piperazin-N'-(2-Äthansulfonsäure)
HPLC	-	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (High-Pressure Liquid Chromatography)
^{125}I	-	radioaktives Isotop Jod 125
IgG	-	Immunglobulin G
IPM	-	Impulse pro Minute
KCl	-	Kaliumchlorid
KG	-	Körpergewicht
KHK	-	Koronare Herzkrankheit
k_m	-	Michaelis-Konstante
Mes	-	(2-(N-Morpholino)-Äthansulfonsäure)
MG	-	Molekulargewicht
MgCl_2	-	Magnesiumchlorid
NaCl	-	Natriumchlorid
NaN_3	-	Natriumnitrit
NaP	-	Natriumphosphatpuffer
OP	-	Operationssaal
^{32}P	-	radioaktives Isotop Phosphor 32
pAVK	-	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	-	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF	-	Thrombozyten abstammender Wachstumsfaktor (Platelet-derived Growth Factor)
PET	-	Polyäthylenterephthalat
Phosp.-Serin	-	Phosphatidyl-Serin
PKA	-	Proteinkinase A
PKC	-	Proteinkinase C
PLA_2	-	Phospholipase A_2
PLC	-	Phospholipase C
PMSF	-	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
PtdInsP_2	-	Phosphatidylinositol-Biphosphat

PTFE	-	Poly-Tetra-Fluor-Äthylen (Poly Tetra Fluoro Ethylene)
PU	-	Polyurethan
RSA	-	Rinderserumalbumin
SDS-PAGE	-	Sodium-Dodecyl-Sulfat Poly-Acryl-Gel-Elektrophorese
Ser	-	Aminosäure Serin
TCA	-	Trichlor-Essigsäure
TFA	-	Trifluor-Essigsäure
TGF	-	Transformierender Wachstumsfaktor
Thr	-	Aminosäure Threonin
TNF	-	Tumor Nekrosefaktor
Tris	-	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	-	Umdrehungen pro Minute
v_{\max}	-	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
VPF	-	Gefäßpermeabilitätsfaktor (Vascular Permeability Factor)

1.2 Definitionen

Enzymeinheit:

Eine internationale Einheit IE = U (Unit) ist die Enzymmenge, die die Umwandlung von 1 μmol Substrat pro Minute unter Standardbedingungen (Temperatur- und pH-Optimum, Substratsättigung) katalysiert.

Michaelis-Konstante (k_m):

Substratkonzentration in $\mu\text{mol/l} = \mu\text{M}$ bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit ($1/2 v_{\max}$) erreicht ist.

Spez. Aktivität:

Einheiten eines Enzyms pro mg Protein (U/mg) \Leftrightarrow μmol Substratumsatz/min/mg Enzymprotein

1.3 Formeln

Formel zur Berechnung der Kreisfläche KF:

$$KF = \pi \times r^2 \quad (\text{Formel 1})$$

Formel zur Berechnung der Standardabweichung SD:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum x^2 - n\bar{x}^2}{N-1}} \quad (\text{Formel 2})$$

X = Ausgezählte Gefäße/mm² pro Präparat; \bar{x} = Mittelwert der gezählten Gefäße;
N = Anzahl der ausgezählten Präparate je Gruppe.

Formel zur Berechnung der aktuellen spezifischen Tagesaktivität ASA von ³²P-Phosphor:

$$ASA = \frac{D_F}{\frac{1}{SA_{cal}} - \frac{[1 - D_F]}{9120}} \quad (\text{Formel 3})$$

D_F = Zerfallskonstante; SA_{cal} = Spezifische Aktivität am Kalibrierungstag des Herstellers;
9120 = Theoretische spezifische Aktivität freien ³²P.

Formel zur Berechnung der Zentrifugalkraft RCF in g:

$$RCF (x\ g) = 1,118 \times 10^{-5} \times r \times N^2 \quad (\text{Formel 4})$$

r = Radius; N = Umdrehungszahl Upm

Formel zur Berechnung der Substratphosphorylierung über den Einbau von ^{32}P -Phosphor:

$$E = \frac{Z \times Vf \times Vol \times Zk}{SA} \quad (\text{Formel 5})$$

E = ^{32}P -Inkorporation (pmol)

Z = gemessene Zerfälle (IPM)

Vf = Verdünnungsfaktor

Vol = Fraktionsvolumen (μl)

Zk = Zerfallskonstante

SA = Spezifische Aktivität (IPM \times pmol^{-1})

Formel zur Berechnung der spezifischen Enzymaktivität SEA:

$$SEA = \frac{SU}{EP} \quad (\text{Formel 6})$$

SU = Substratumsatz in $\mu\text{mol}/\text{min}$

EP = Enzymprotein in mg

2. EINLEITUNG

2.1 Bedeutung und bisherige Behandlungskonzepte vaskulärer Erkrankungen

In der westlichen Welt stehen an der Spitze der Todesursachen vaskuläre Erkrankungen, deren Hauptvertreter die arterielle Verschlusskrankheit ist. Synonym werden für diese Erkrankung die Begriffe Arteriosklerose, Atheromatose, Gefäßverkalkung und Durchblutungsstörungen verwendet. Hauptlokalisationen arteriosklerotischer Veränderungen sind die Koronarien und die supraaortalen, das Gehirn versorgenden Gefäße. An den Herzkranzgefäßen führen sie zu der sog. koronaren Herzkrankheit (KHK), deren irreversibler Endzustand der Herzinfarkt ist. Arteriosklerotische Läsionen an den supraaortalen Gefäßen führen häufig akut zum Schlaganfall (Apoplex) mit mehr oder weniger starken irreversiblen Hirnfunktionsausfällen (Lähmungen, Sprachstörungen, Gedächtnisverlust, Sehstörungen u. a.). Eine verkürzte Lebenserwartung und frühzeitiger Tod sind häufig die Folge eines Apoplexes mit bleibenden Lähmungen, eines schweren Herzinfarktes mit Rhythmusstörungen und Herzinsuffizienz, oder des Endstadiums der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) nach Extremitätenverlust durch Amputation. Subsummiert man zu den Todesfällen der arteriosklerotischen Gefäßerkrankungen die wesentlich höhere Anzahl chronisch kranker und dauernd pflegebedürftiger Menschen trotz aller Fortschritte in der medizinischen und sozialen Rehabilitation, so wird das ganze Ausmaß an millionenfachem individuellem Leid und Siechtum offenbar. Hinzu kommen die immensen Behandlungs- und Folgekosten, die diese Erkrankungen verursachen. Sie sind von stetig steigender volkswirtschaftlicher Bedeutung und werden mit zunehmender Überalterung der westlichen Gesellschaften bedeutungsvoller. So zählen der Herzinfarkt und die koronare Herzkrankheit mit zu den Hauptursachen für berufliche Frühinvalidisierung in den Industrienationen. Jahrzehntelange intensive Forschung konnte bisher die Ätiologie und die molekulare Genese der arteriosklerotischen Gefäßerkrankungen nicht aufklären. Wahrscheinlich liegt ein multifaktorielles Geschehen zugrunde, dem aber vor Ort am Gefäß, an den Endothelzellen eine Blockierung oder Fehlsteuerung nur weniger molekularbiologischer Schlüsselreaktionen zugrundeliegt. Wesentlich beteiligt an der Entwicklung arteriosklerotischer Erkrankungen sind die folgenden drei Mechanismen: 1) – erhöhter Tonus der Gefäßwand mit Vasokonstriktion, 2) – Aktivierung von Gerinnungsfaktoren und verstärkte Thrombozyten-Gefäßwand-Interaktionen, 3) – verstärkte Proliferation von glatten Gefäßwandmuskelzellen (Luscher, 1994). Tierexperimentelle Modelle und Transfilter-Co-Kulturen, die den Aufbau einer Gefäßwand in vitro imitieren, haben wesentliche Erkenntnisse über die initialen zellulären Reaktionen bei der Entstehung atheromatöser Plaques geliefert (Betz, 1991). Die Behandlung der arteriosklerotischen Gefäßerkrankungen ist polypragmatisch und ruht bisher im wesentlichen auf drei Behandlungsstrategien:

1. Prophylaxe,
2. Früherkennung,
3. Palliation.

Epidemiologische und sozio-kulturelle vergleichende Untersuchungen großer Bevölkerungsgruppen haben zur Evaluation einer Reihe von Risikofaktoren geführt, wie Nikotinabusus,

Bewegungsmangel, Übergewicht, Distress, Hypertonie, Diabetes mellitus, Fettstoffwechselstörungen, um nur die bekanntesten aufzuzählen. Die Früherkennung und Ausschaltung der Risikofaktoren kann im Einzelfall die klinisch-manifeste Erkrankung des Patienten um Jahre hinaus verzögern. Für den klinisch-tätigen Arzt stehen zur Behandlung des symptomatischen und manifest erkrankten Patienten, zwar akut wirksame, aber insgesamt nur palliative Behandlungsverfahren mit zum Teil noch nicht befriedigender Langzeitwirkung (z. B. Ballondilatation von Stenosen, Bypasschirurgie) zur Verfügung. Innovationen im medizin-technischen und -apparativen Bereich, wie die Entwicklung der modernen Intensivtherapie, der Intubationsnarkose und Respiratorbehandlung, der Herzkatheteruntersuchung, der Herz-Lungen-Maschine, der mikrochirurgischen Operationstechniken, der Gefäßprothesen, um nur einige zu nennen, ermöglichten eine erhebliche Erweiterung des Behandlungsspektrums kardiovaskulärer Erkrankungen mit drastischer Verbesserung der Überlebenschance für Apoplex und Herzinfarkt. Die Weiterentwicklung und Standardisierung der Arbeitstechniken führten zu einer Risikoabsenkung unter 5 % für viele Eingriffe zur vorbeugenden, palliativen Revaskularisation von kritischen Gefäßengstellen durch Ballondilatation oder Bypasschirurgie. Trotz aller Erfolge dieser Maßnahmen bleibt ein wieder zunehmend größeres Kollektiv von gefäßkranken Patienten, das keiner erfolgsversprechenden Behandlungsmaßnahme zugeführt werden kann. So sind multilokale und diffuse Gefäßveränderungen häufig nicht erfolgsversprechend durch Bypasschirurgie und interventionelle Maßnahmen anzugehen. Mit der Zunahme gefäßchirurgischer und interventioneller Therapien steigt auch die Zahl an Patienten, die nach mehr oder weniger langem Behandlungserfolg erneut symptomatisch werden und zu einem Reeingriff anstehen. Bei diesen Patienten ist oft kein geeignetes körpereigenes Bypassmaterial (z. B. Vena saphena, Arteria thoracica interna) mehr vorhanden. In diesen Fällen ist eine bypasschirurgische Revaskularisierung nur unter Verwendung von avitalen, heterologen, biologischen oder von synthetischen, aus nicht biologischen Materialien (z. B. PTFE, PET, PU) gefertigten Gefäßprothesen möglich. Bei den biologischen Gefäßprothesen ist die Haltbarkeit noch nicht befriedigend. Sie neigen zur Ausbildung von Prothesenaneurysmen bzw. zu vorzeitiger Verkalkung. Die synthetischen Gefäßprothesen zeigen bei Prothesendurchmessern von ≤ 6 mm noch keine zufriedenstellende Offenheitsrate. Bei Prothesendurchmessern ≤ 4 mm ist aufgrund der schlechten Offenheitsrate ein klinischer Einsatz nur in Extremfällen vertretbar.

Die Entdeckung von Faktoren, die die Neubildung von Gefäßen induzieren und die Migration und Proliferation von Endothelzellen stimulieren, können für therapeutische Revaskularisationen völlig neue Perspektiven eröffnen. Der Untersuchung verschiedener Aspekte der Angiogenese, speziell der Wirkung des Wachstumsfaktors Angiogenin ist die folgende Arbeit gewidmet. Die Durchführung der Experimente erfolgte im Rahmen eines 15-monatigen Forschungsaufenthaltes am Center for Biochemical and Biophysical Sciences and Medicine der Harvard University, sowie im Department for Cardiovascular Surgery, Brigham & Womens Hospital, Harvard Medical School in Boston/USA. Die Erstisolierung und die Charakterisierung von Angiogenin erfolgten unter der Leitung von Prof. Dr. B.L. Vallee in diesem Labor.

2.2 Wegweisende Erkenntnisse und Techniken zur Untersuchung der Angiogenese in vitro und in vivo

Die Bildung neuer Gefäße wird als Angiogenese bezeichnet. Dieser Begriff wurde 1935 eingeführt zur Beschreibung der Gefäßneubildung in der Plazenta (Folkman et Klagsbrun, 1987). Bereits 1794 beschrieb John Hunter die Neubildung von Gefäßen im Rahmen der Wundheilung und der normalen embryonalen Entwicklung (Hudlicka et Tyler, 1986). Als physiologischer Prozeß findet die Neubildung von Gefäßen periodisch im Rahmen des monatlichen Zyklus im Endometrium der Frau statt. Auch die Vaskularisierung der Plazenta im Rahmen der Schwangerschaft stellt sich als physiologischer Angiogenesevorgang dar. Bei chronischen arteriellen Gefäßverschlüssen ist fast immer eine ausgeprägte Kollateralenbildung nachweisbar, die zum Teil aus der Erweiterung präformierter Kollateralen zum Teil aber auch aus neugebildeten Gefäßen besteht. Im gesunden, erwachsenen Individuum ist die Angiogenese streng reguliert und auf reparative Prozesse im Rahmen der Wund- und Knochenbruchheilung beschränkt. Im Rahmen vieler pathologischer Prozesse – von der Entzündung bis zum Tumorwachstum – ist die strenge Regulation der Angiogenese aufgehoben, und es kommt zu einer überschießenden und/oder pathologischen Gefäßneubildung. Diese Erkrankungen bezeichnet man auch als "angiogenesis dependent diseases". Arthropathien, diabetische Retinopathien, Glaukom, Kornealäsionen, retrolentale Fibroplasie, Wundheilungsstörungen, Gefäßmißbildungen, Hämangiome und Tumoren werden dazugezählt (Plate, 1993).

1885 erkannte Bobritzky, daß die Migration von Endothelzellen der Ausgangspunkt neuer sich entwickelnder Kapillaren darstellt (Hudlicka et Tyler, 1986). Trotz dieses Wissens wurde die Endothelzelle lange nur als mechanische innere Gefäßauskleidung, als Blutbarriere angesehen. Neue Untersuchungen zeigten, daß die Verbindung der Endothelzellen untereinander nicht statisch, sondern erheblichen Veränderungen unterworfen ist. Sie ist eine Funktion vieler Mechanismen und Einflußfaktoren (Caveda et al., 1994; Ghabriel et al., 1994; Morel et al., 1994; Northover et Northover, 1994; Schnitzer, 1993).

Erst die Entwicklung der Zellkulturtechnik, die die in vitro Kultivierung von Endothelzellen ermöglichte, führte zu der Erkenntnis, daß die Endothelzelle mehr als nur eine mechanische Barriere darstellt (Booyse et al., 1975). Ihr kommt eine zentrale Stellung im intra-extravasalen Stoff- und Informationsaustausch zu. In vivo steht die Endothelzelle in engem Kontakt und Informationsaustausch einmal mit den benachbarten Endothelzellen, aber auch mit multiplen Blutkomponenten (z. B. Granulozyten, Lymphozyten, Thrombozyten, Gerinnungsfaktoren, aber auch Faktoren der Fibrinolyse), wobei sog. Adhäsionsmoleküle eine erhebliche Rolle spielen. Sie spielt auch eine zentrale Rolle bei der Balance zwischen gerinnungsaktivierenden und fibrinolytischen Prozessen (Gertler et Abbott, 1992; Sung et al., 1994). Die Endothelzelle interagiert und kommuniziert auch mit der extrazellulären Matrix, die Basalmembran eingeschlossen, mit den Fibroblasten und den Gefäßmuskelzellen (Delvos et al., 1982; Lewis et Shah, 1994). Die Regulation des Gefäßtonus wird entscheidend vom Endothel beeinflusst (Sun et al., 1993). Das Endothel kleidet in seiner Gesamtheit beim Menschen eine innere Oberfläche von ca. 1000 m² aus und stellt sowohl eines der größten, als auch der stoffwechselaktivsten Organe dar (Zilla et al., 1993), wie eine Vielzahl inzwischen bekannter und von der Endothelzelle synthetisierter und in die extrazelluläre Matrix sezernierter Wachstumsfaktoren belegt (Folkman et Klagsbrun, 1987; Folkman et Shing, 1992; Klagsbrun et Dluz, 1993;

Tomasi et al., 1990). Auch Heparin spielt bei der Interaktion zwischen glatter Gefäßwandmuskelzelle und Endothelzelle eine zentrale Rolle mit hemmenden Einflüssen auf die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen und einer stimulierenden Wirkung auf Proliferation und Migration von Endothelzellen (Hämmerle et al., 1991).

Untersuchungen von Ausprunk et Folkman (1977), Myrhage et Hudlicka (1978) und Folkman et al. (1981) ergaben, daß das Wachstum neuer Gefäße sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen vom venösen Ende bestehender Kapillaren ausgeht. Es kommt zu einem Aufbrechen der Basalmembran unter der Wirkung von Proteinasen, die von Endothelzellen freigesetzt werden (Glaser et al., 1983). Anschließend bilden die Endothelzellen Pseudopodien aus, die sich durch die entstandenen Lücken in der Basalmembran ausstülpfen und die Migration der Endothelzelle in den perivaskulären Raum einleiten. Erste Endothelzellteilungen werden 1–2 Tage später beobachtet. So entstandene Endothelzellsprossen bilden Vakuolen aus, die zur Ausbildung eines Lumens führen. Diese Kapillarsprossen verbinden sich mit anderen Kapillarsprossen oder finden Anschluß an vorhandene Gefäße. Der mikro-anatomische Ablauf der Gefäßneubildung wurde bereits von Maximov (1902) beschrieben. Aufgrund der komplexen Verhältnisse war lange Zeit unbekannt, welche Faktoren bei der Gefäßneubildung eine Rolle spielen. Mechanische Faktoren als Ursache von Kapillarsprossung und Gefäßneubildung wurden anhand von Beobachtungen von Landerer im Zusammenhang mit Veränderungen des Blutflusses sehr früh diskutiert (Marchand, 1929). Neuere Untersuchungen wiesen in der Tat nach, daß Endothelzellen Sensoren besitzen, die Flußsignale registrieren und Scherkräfte messen können (Akira et Ando, 1993). Die Gefäßneubildung im Rahmen von Entzündungen, Wundheilungsprozessen und bei Tumoren ließ sich mit diesem Modell – der Einwirkung von Scherkräften auf die Endothelzellen – nicht erklären.

Wachstumsfaktoren mit angiogenetischer Potenz wurden erstmals aus Tumorzellen 1968 isoliert. Sie fokussierten das Interesse auf hormonähnliche, möglicherweise nur lokal begrenzt wirkende Angiogenesefaktoren (Rijhsinghani et al., 1968; Ehrmann et Knoth, 1968). Mit der Entwicklung des Hühnerei-Chorion-Allantois-Membrantestes (CAM-Assay) und Kaninchen-Hornhauttestes Mitte der siebziger Jahre standen geeignete in vitro Testverfahren zur Verfügung, die die Überprüfung der angiogenetischen Potenz isolierter Faktoren erlaubten. Die ersten isolierten und rein dargestellten Angiogenesefaktoren zeigten eine hohe Bindungsaffinität zu Heparin und Substanzen der extrazellulären Matrix. Prototypen dieser Faktoren sind der saure Fibroblasten-Wachstumsfaktor (aFGF) und der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF). Sie zeigten im CAM-Assay angiogenetische Potenz im Nanogramm-Bereich und erwiesen sich in Zellkulturen als essentiell für das Wachstum von Endothelzellen (Gospodarowicz et al., 1976). Bei dem Prozeß der Angiogenese interagieren Zellen (Endothelzellen, Fibroblasten, Perizyten), Matrixsubstanzen (Collagen, Laminin, Fibronectin, Proteoglykane), und lösliche Wachstumsfaktoren (z. B. FGF, Epidermal Growth Factor (EGF), Transforming Growth Factor (TGF), Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Tumor Necrosis Factor (TNF), Vascular Permeability Factor (VPF), Angiogenin (ANG), u.a. eng miteinander (Furcht, 1986; Plate, 1993). Unter der Stimulation von Wachstumsfaktoren werden viele Bestandteile der extrazellulären Matrix (Fibronectin, Laminin, Collagen IV und Collagen I) in den Endothelzellen synthetisiert und im Verlauf der Angiogenese in den Extrazellulärraum sezerniert (Papadimitriou et al., 1993). bFGF konnte inzwischen aus einer Vielzahl von Geweben verschiedener Spezies isoliert werden (Burgess et Maciag, 1989). Angiogenin

wurde erstmals 1985 aus einer Zellkultur menschlicher Adenokarzinomzellen isoliert und charakterisiert (Fett et al., 1985; Strydom et al., 1985). Angiogenin zeigte sich angiogenetisch als ebenso potent wie FGF. Die Bindung an Heparin ist jedoch wesentlich geringer ausgeprägt als bei FGF, und es ist in wässriger Lösung bei +4° C im Gegensatz zu FGF stabil.

2.3 Struktur der Arbeit

Zur Untersuchung verschiedener Aspekte der Angiogenese unter besonderer Berücksichtigung von Angiogenin ist die Arbeit in drei methodisch verschiedene Sektionen unterteilt:

Sektion I

Indirekte Revaskularisierungsverfahren am Herzen wurden bereits Anfang der fünfziger Jahre vor Entwicklung der Technik der chirurgischen Mikroanastomose von Vineberg mit wechselndem und mäßigem Erfolg durchgeführt. Zur Verbesserung der Durchblutung ischämischer Herzmuskelareale wurde der freipräparierte Pedikel der Arteria thoracica interna als gestielter Gefäßpedikel ohne Gefäßanastomose in den Herzmuskel implantiert und die Revaskularisierung durch aussprossende und mit der Arteria thoracica interna kommunizierende Kapillaren im Rahmen des Heilungsprozesses erreicht. Das Ausmaß der Revaskularisierung war oft unzureichend, weshalb dieses Operationsverfahren nach Beherrschen der Mikroanastomosentechnik wieder verlassen wurde. Unter der Stimulation angiogenetischer Faktoren ist möglicherweise eine deutliche Verbesserung indirekter Revaskularisierungsverfahren zu erzielen.

Zur Untersuchung dieser Frage wurde ein standardisiertes Tiermodell in der Ratte entwickelt, das die in vivo Wirkung von lokal applizierten angiogenetischen Faktoren auf die Gefäßneubildung in ischämischen Geweben gewährleistet. Die Quantifizierung erfolgte über die Messung der lokalen Gefäßneubildung im Sinne der indirekten Revaskularisierung.

Das Tiermodell ist zur Abschätzung der Potenz angiogenetischer Faktoren für den therapeutischen Einsatz bei indirekten Revaskularisierungsverfahren anwendbar. Zur Minimierung interindividueller Unterschiede wurden nur männliche Lewis Inzuchtratten des gleichen Stammes und gleichen Alters verwendet.

Im 1. Teil der Sektion I wird im standardisierten Rattenmodell die Stimulation der Gefäßneubildung in vivo über einen Zeitraum bis 70 Tage nach Ischämieinduktion und lokaler Applikation von Angiogenin verfolgt und quantitativ ausgewertet.

Im 2. Teil der Sektion I werden im standardisierten Rattenmodell die Dosis-Wirkungsbeziehungen von Angiogenin und bFGF bezüglich ihrer angiogenetischen Potenz 7 Tage nach lokaler Applikation quantitativ untersucht.

Sektion II

Wie in vitro Untersuchungen an Endothelzellkulturen zeigten, haben viele angiogenetisch wirksame Faktoren direkte und indirekte Wirkungen auf Endothelzellen, die sich im wesentlichen auf drei Eigenschaften der Endothelzellen auswirken:

1. Erhöhung der der Migrationsfähigkeit der Endothelzellen,
2. Erhöhung des zellulären Stoffwechsels und Stimulation der Zellteilung und
3. Verstärkung der Adhäsion an geeigneten Oberflächen.

Wie neue Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Deutsch in Wien ergaben, führt die angiogenetische Beschichtung von synthetischen Gefäßprothesen aus PTFE in vitro zu einer schnellen und effektiven Endothelialisierung der Prothese mit kultivierten Endothelzellen, die dann die Biokompatibilität der Prothesen in vivo deutlich verbessern. Um die Wirkung angiogenetischer Beschichtungen von Gefäßprothesen zu testen, wird in dieser methodischen Sektion II der Arbeit ein Tiermodell bei White New Zealand Kaninchen vorgestellt, daß zur in vivo Testung der Offenheitsrate schmallumiger Gefäßprothesen (\varnothing 2–4 mm) geeignet ist. Die Beschichtung dieser kleinkalibrigen Gefäßprothesen mit Matrixfaktoren und Angiogenesefaktoren (Angiogenin, bFGF, Heparin) erfolgte mit einer neu entwickelten Methode. Erste Ergebnisse über die Offenheitsrate derart beschichteter 2 mm PTFE-Gefäßprothesen werden im Kaninchenmodell vorgestellt.

Sektion III

Im letzten methodischen Block dieser Arbeit wird die in vitro Phosphorylierung von Angiogenin durch Proteinkinase C (PKC) standardisiert und optimiert. Die Charakterisierung und Reinigung des phosphorylierten Proteins wird dargestellt. Die Herstellung und Untersuchung phosphorylierten Angiogenins wurde intensiv bearbeitet, da PKC in viele zelluläre Informationsprozesse (second messenger, signalling process) involviert ist (Huang, 1990). Besondere Bedeutung scheint der PKC in der Informationsübertragung von extra- nach intrazellulär zuzukommen (Kikkawa et Nishizuka, 1986; Kikkawa et al., 1989; Sung et al., 1994). Bei der Interaktion zwischen bFGF und Bestandteilen der extrazellulären Matrix (Collagen II) ist die PKC in den Prozeß der Herunterregulierung der Expression von Collagen II involviert (Bradham et al., 1994). PKC ist neben der Stimulierung vieler "signalling" Prozesse auch in hemmende Mechanismen mit Blockierung der Signal-Transduktion als ein Teil eines Rückkoppelungsmechanismus ("feedback") eingebunden (El-Fakahany et al., 1988). Der Nachweis einer entsprechenden Aminosäuresequenz in der Struktur des Angiogenins, die als Substrat zur Phosphorylierung durch PKC geeignet ist, führte zu der Vermutung, daß PKC und Angiogenin möglicherweise in dieselben second messenger Prozesse involviert sind. Um die Rolle und Funktion phosphorylierten Angiogenins zu untersuchen, war ein gangbarer Weg phosphoryliertes Angiogenin in vitro in einem Phosphorylierungsansatz mit PKC herzustellen.

3. FRAGESTELLUNG

Zur quantitativen Untersuchung der Rolle und Bedeutung angiogenetisch wirksamer Faktoren bei der indirekten Revaskularisation (Angiogenese) ischämischer Gewebe unter besonderer Berücksichtigung des Angiogenins war die Aufgabe ein standardisiertes Modell zu entwickeln. Der erste Teil dieser Arbeit ist diesem Thema gewidmet. Zur Verbesserung der Biokompatibilität synthetischer, kleinkalibriger Gefäßprothesen war eine Methode zur angiogenetischen Beschichtung von Prothesen zu entwickeln und ein geeignetes Tiermodell zur in vivo Testung der "patency rate" der Prothesen zu standardisieren. Diesen Aufgaben wird im zweiten Teil der Arbeit Rechnung getragen. Zur Verbesserung des Verständnisses der molekularen Wirkungsmechanismen, die der Interaktion von Angiogenin mit Endothelzellen zugrundeliegen, wird eine Methode zur Herstellung und Reinigung phosphorylierten Angiogenins standardisiert und beschrieben unter Verwendung von Proteinkinase C, einem Enzym, das in vivo für viele extrazelluläre Signalübertragungen und sog. "second messenger" Prozesse auf zellulärer Ebene eine zentrale Stellung einnimmt. Anhand der in den drei Sektionen standardisierten Verfahren soll folgenden Fragen nachgegangen werden:

1. Ist die Wirkung angiogenetischer Faktoren in einem standardisierten Tiermodell quantifizierbar?
2. Welche Langzeitwirkung hat Angiogenin in vivo bei der Revaskularisierung ischämischer Gewebe im standardisierten Tiermodell?
3. Über welchen Zeitraum lassen sich im standardisierten Tiermodell in vivo angiogenetische Effekte von lokal appliziertem Angiogenin nachweisen?
4. Gibt es für die angiogenetische Wirkung von Angiogenin und bFGF in vivo eine Dosis-Wirkungsbeziehung?
5. Sind Angiogenin und bFGF in ihrer angiogenetischen Potenz gleich? Wenn nicht, worin unterscheiden sie sich?
6. Lassen sich die angiogenetische Wirkung von bFGF und Angiogenin zur indirekten Vas-kularisierung nutzen?
7. Sind angiogenetische Faktoren, insbesondere Angiogenin und bFGF allein oder in Kombination zur Verbesserung der Biokompatibilität schmallumiger, synthetischer, nicht biologischer Gefäßprothesen geeignet?
8. Ist mit angiogenetisch beschichteten Gefäßprothesen eine Endothelialisierung der Prothese in vivo und in situ möglich?
9. Ist die Modifizierung des Angiogeninmoleküls durch Phosphorylierung mit Proteinkinase C in vitro möglich?

10. Mit welchen Methoden lässt sich phosphoryliertes Angiogenin nachweisen?
11. Welche Methoden sind geeignet phosphoryliertes Angiogenin zu isolieren und zu reinigen?
12. Stellt die Phosphorylierung von Angiogenin durch PKC möglicherweise eine physiologische Reaktion in der Wirkungskette von Angiogenin dar?

4. SEKTION I:

Quantitative Untersuchung zur Stimulierung der indirekten Revaskularisierung ischämischer Gewebe durch Wachstumsfaktoren im standardisierten Tiermodell an der Ratte

4.1 Vorbemerkungen

Ischämische Bedingungen in lebenden Geweben erzeugen eine Kapillarproliferation und Angiogenese (Olivetti et al., 1989; Phillips et Knighton, 1990; Marx, 1987; D'Amore et Thompson, 1987). Der Mechanismus der Angiogenese unter ischämischen Bedingungen und die beteiligten angiogenetischen Faktoren sind bisher nicht ausreichend bekannt. Möglicherweise sind einige Schlüsselsubstanzen zur Induktion von Gefäßneubildungen sogar auf Abruf in der extrazellulären Matrix gelagert und werden im Falle der Schädigung am Ort der Verletzung freigesetzt, wie die angiogenetische Aktivität traumatisierter Skelettmuskeln vom Kaninchen vermuten läßt (Phillips et al., 1990). Viele angiogenetische Faktoren konnten gereinigt und biochemisch charakterisiert werden. Sie induzieren die Angiogenese in Form des Wachstums neuer Blutgefäße im Hühnerchorionallantoismembrantest (CAM-Assay) und im Kaninchenhornhauttest (Folkman et Klagsbrun, 1987; Tomasi et al., 1990). Die Angiogenese ist ein bedeutender Faktor in der embryonalen Organentwicklung (Folkman et Klagsbrun, 1987). Aber auch bei erwachsenen Individuen kommt die Angiogenese, allerdings in streng regulierter Form und zeitlich eng begrenzt vor, z. B. in Kombination mit der Wundheilung und Knochenbruchheilung. Eine Ausnahme stellt das weibliche Fortpflanzungsorgan dar. Während der periodischen Follikel-Corpus luteum Entwicklung und der sich entwickelnden Plazenta während einer Schwangerschaft findet regelmäßig eine Neovaskularisation und Angiogenese statt (Burgess et Maciag, 1989). Im Gegensatz zu diesen physiologischen Prozessen steht die Angiogenese bei pathologischen Vorgängen, wie zum Beispiel dem Tumorwachstum, der diabetischen Retinopathie, dem rheumatoiden Krankheitskreis und den okklusiven Gefäßerkrankungen. Bei diesen pathologischen Prozessen ist die Gefäßneubildung ein häufiges Ereignis im Gegensatz zu dem sonst unter normalen physiologischen Bedingungen streng regulierten Prozeß. Räumlich ausgerichtete Gefäßneubildung konnte in situ in der Peritonealhöhle von Ratten studiert werden. Nach der Implantation von Gelatine und saurem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (aFGF) beschichteten Schwämmen wurde eine anhaltende Gefäßneubildung in dreidimensionaler Ausrichtung bis zu 4 Wochen beobachtet (Burgess et Maciag, 1989). Um den Langzeiteffekt von Gefäßneubildungen (Angiogenese) zu untersuchen, wurden vor Ort nicht absorbierbare solide Polymere mit guter Gewebeverträglichkeit wie z. B. expandiertes Polytetrafluoräthylen (ePTFE) eingesetzt (Thompson et al., 1988). Die ePTFE-Fasern wurden mit Komponenten der extrazellulären Matrix und zusätzlich mit aFGF beschichtet. Mit dieser Kombination konnte eine stabile, räumlich ausgerichtete Neovaskularisation in der Peritonealhöhle von Ratten erzeugt werden (Thompson et al., 1988). Mit dem Wissen, daß extra-zelluläre Matrixsubstanzen wie z. B. Collagen I notwendig sind, um die Migration und Anheftung von Endothelzellen zu unterstützen (Furcht, 1986; Delvos et al., 1982; Montesano et al., 1983), wurden in unserem Tiermodell Collagen I beschichtete ePTFE-Fasern als solide Leitschiene benutzt. Angiogenin ist ein einsträngiges Protein, das

zuerst aus in Zellkultur gezüchteten menschlichen Adenokarzinom-Zelllinien (HT-29) isoliert wurde (Fett et al., 1985). Angiogenin wurde auch im menschlichen Blutplasma gesunder Probanden nachgewiesen (Shapiro et al., 1987). Angiogenin hat ein Molekulargewicht von 14400 Dalton und besteht aus 123 Aminosäuren. Die Aminosäuresequenz ist zu 35 % identisch mit den Pankreasribonukleasen (Vallee et Riordan, 1988). Angiogenin zeigte sich im CAM-Assay und Kaninchenkorneatest als potenter Stimulator der Gefäßneubildung in vivo (Shapiro et al., 1987; Fett et al., 1987). In Endothelzellkulturen konnte eine starke spezifische Bindung von Angiogenin an Endothelzellen verschiedener Herkunft nachgewiesen werden (Badet et al., 1989). Ein weiterer Hinweis, daß Angiogenin direkt mit den Endothelzellen interagiert, stellte der Nachweis eines 42-kDa endothelialen Zellmembranproteins dar, daß spezifisch Angiogenin bindet (Hu et al., 1991). Wie weitere Untersuchungen ergaben, handelt es sich dabei um Aktin (Hu et al., 1993). An der Zelloberfläche von Endothelzellen in Zellkultur wurde Aktin als Membranprotein nachgewiesen (Moroianu et al., 1993).

Der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) ist ein Mitogen, der in viele proliferative Prozesse involviert ist und nicht nur angiogenetisch wirkt (Gospodarowicz et al., 1986; Dono et Zeller, 1994). Die angiogenetische Potenz von bFGF als Mitogen für endotheliale Zellen in vitro und in vivo ist gesichert (Gospodarowicz et al., 1986; Thomas et Gimenez-Gallego, 1986; Thompson et al., 1989). Auch konnte das Mitwirken von bFGF im Prozeß der Wundheilung, vor allem seine Fähigkeit die Wundheilung zu beschleunigen, eindeutig nachgewiesen werden (Davidson et al., 1988). Die Bildung von Granulationsgewebe ist eine Kombination von Fibroblastenproliferation und Neovaskularisation. Die Neovaskularisation wird als der limitierende Schritt in der Wundheilung angesehen. Re-Endothelialisierung von denudierten Rattenarterien konnte durch bFGF stimuliert werden und resultierte in einer erhöhten Replikationsrate endothelialer Zellen (Lindner et al., 1989; Lindner et al., 1990). Die Bindung von bFGF an Substanzen der extrazellulären Matrix und deren Freisetzung von dort zur Stimulierung der Angiogenese werden bei Baskin et al., (1989) beschrieben. Unter ischämischen Bedingungen scheint bFGF eine bedeutende Rolle in der Interaktion mit den Angiogenesefaktoren zu spielen, wie Untersuchungen im neuronalen Zellbereich nachweisen konnten (Endoh et al., 1994). Für die Angiogenese im Rahmen des Wachstums von Tumoren wird für bFGF ebenfalls eine bedeutende Rolle diskutiert (Li et al., 1994). Die indirekte Revaskularisierung von Randzonen gestielter Lappen konnte bei Ratten durch die Gabe von bFGF stimuliert werden (Ishiguro et al., 1994).

4.2 Tiermodell

Als Tierspezies für die Untersuchungen wurden Ratten ausgewählt, weil sie die Durchführung großer Versuchsserien unter standardisierbaren Bedingungen erlauben. Durch die Verfügbarkeit von Inzuchtstämmen aus kontrollierter Zucht lassen sich die interindividuellen Unterschiede im Versuchskollektiv reduzieren. Im vorliegenden Tiermodell wurden männliche Lewis Inzuchtratten des gleichen Stammes und gleichen Alters verwendet. Zur Erzeugung einer Ischämie wurde die A. femoralis einschließlich der Femoralisbifurkation freipräpariert (ABB. 1) und auf 1 cm Länge an beiden Rattenhinterläufen reseziert. Die Gefäßstümpfe wurden zur Vermeidung von Blutungen sorgfältig ligiert. Als Leitschiene und Orientierungsmerkmal zur Beurteilung der Angiogenese diente ein 1 cm langer expandierter Poly-Tetra-

Fluor-Äthylen-Faden (ePTFE) der Stärke 6x0 ($d = 0,23 \text{ mm}$), der mit Matrixfaktoren und/oder angiogenetischen Proteinen beschichtet und an Stelle des resezierten Gefäßes interponiert wurde (ABB. 2). Nach verschiedenen Zeitintervallen wurde das Gewebe mit Formalin fixiert. Es wurden Gewebsschnitte orthograd zum implantierten PTFE-Faden hergestellt. Die Anzahl der Gefäße wurde im Radius von $0,575 \text{ mm}$ um den Faden, einer Fläche von ca. 1 mm^2 entsprechend, unter Projektion eines geeichten, metrischen Rasters auf das Präparat bei 100-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop ausgezählt.

4.3 Untersuchung der Langzeiteffekte von Angiogenin

4.3.1 Material und Methoden

4.3.1.1 Beschichtung der PTFE-Fäden mit Collagen I und Angiogenin

Sterile 6-0 ePTFE-Fäden, Durchmesser $0,23 \text{ mm}$ (Goretex von der Fa. Gore Incorporation) wurden in 1 cm lange Stücke geschnitten und in $0,01 \text{ \%}$ -iger steriler Collagen I-Lösung in $0,1 \text{ M}$ Essigsäure für 24 Stunden bei Zimmertemperatur eingelegt (Collagen I aus Kalbshaut von Sigma Chemical Corporation). Anschließend wurden die einzelnen Fäden luftgetrocknet und 3x mit sterilem pyrogenfreien Wasser (Fa. Travenol) gewaschen, um verbliebene Essigsäure zu entfernen. Eine sterile wäßrige Lösung von $131,5 \text{ ng/ml}$ menschlichem Angiogenin aus rekombinanten *E. coli* Bakterien (hergestellt von Hoechst AG) wurde angesetzt. Die 1 cm langen PTFE-Fäden, die mit Collagen I vorbeschichtet waren, wurden 24 Stunden in die Angiogeninlösung bei 4° C eingelegt. Die nassen PTFE-Fasern wurden dann in sterilen $1,5 \text{ ml}$ Eppendorf-Gefäßen über Nacht lyophilisiert. Anschließend wurden die Eppendorf-Mikrogefäße mit den beschichteten PTFE-Fasern bei 4° C im Dunklen bis zum Gebrauch gelagert.

4.3.1.2 Bestimmung der Angiogeninbindung an PTFE mit ^{125}J -Angiogenin

Die Menge gebundenen Angiogenins an PTFE wurde mittels Bestimmung radioaktiv markierten Angiogenins (^{125}J -Angiogenin) durchgeführt. Zur radioaktiven Markierung des Angiogenins wurde auf zwei verschiedene Methoden zurückgegriffen:

a) Chloramin-T-Methode

Reagenzien:

$0,1 \text{ M}$ Natriumphosphatpuffer (NaP), pH 7,4

(Herstellung: Mische 1 Teil $0,1 \text{ M}$ monobasisches Natriumphosphat NaH_2PO_4 mit 4 Teilen $0,1 \text{ M}$ dibasischem Natriumphosphat Na_2HPO_4 . Reaktionsgefäße müssen absolut Chlorid-frei sein.)

Chloramin T 4 mg/ml in NaP

Hühnereialbumin 1 mg/ml in NaP

Hühnereialbumin 10 mg/ml in NaP

Kaliumjodid 10 mg/ml in NaP

Natriummetabisulfit 2,5 mg/ml in NaP

^{125}Jod , trägerfrei 1 mCi

10 μg Angiogenin in wässriger Lösung (so konzentriert als möglich)

Sephadex G-25 Chromatographiesäule

Jodierung:

1. Waschen der G-25 Säule mit 25 ml NaP, 5 ml Hühnereialbumin (1 mg/ml) und nochmals 25 ml NaP.
2. Füge 40 μl NaP zu dem ^{125}Jod ins Reagenzglas.
3. Pipettiere das Angiogenin in das Reagenzglas.
4. Füge 25 μl Chloramin T zu dem Reaktionsgemisch hinzu.
5. Stoppe die Reaktion nach 2,5 min. mit 100 μl Natriummetabisulfit. Pipettiere 100 μl Kaliumjodid und 200 μl Hühnereialbumin (1 mg/ml) hinzu.
6. Trage die Probe auf die G-25 Säule und sammle das Eluat. 12 Tropfen/Fraktion, insgesamt 11 Fraktionen.
7. Das ^{125}J -Angiogenin erscheint in den Fraktionen 2–3. Die Fraktionen, die mehr als 10 % der Gesamtradioaktivität enthalten, werden gepoolt. Ein äquivalentes Volumen Hühnereialbumin (10 mg/ml) wird zur stabilen Lagerbarkeit hinzugefügt.
8. Das ^{125}J -Angiogenin wird in 400 μl Portionen in bleigeschützten Gefäßen bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

b) Enzymobead^R-Reaktion

Das Enzymobead^R-Reagenz besteht aus immobilisierten Präparationen von Laktoperoxidase und Glukoseoxidase unter Vorhaltung optimaler enzymatischer Aktivität des Systems. Die feste Phase, die die Laktoperoxidase und Glukoseoxidase trägt, besteht aus hydrophilen sphärischen Partikeln von einigen Mikrometern im Durchmesser. Fügt man einer Mischung von Enzymobead^R-Reagenz, Na^{125}J und Protein (hier Angiogenin) sowie Glukose hinzu, so erzeugt die immobilisierte Glukoseoxidase kontinuierlich eine kleine konstante Menge Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Die Laktoperoxidase katalysiert im Austausch über die Reduktion des Wasserstoffperoxids die Oxidation von radioaktiv-markiertem Jodid zu molekularem Jod, das mit dem Protein (Angiogenin) reagiert unter Bildung eines Radiojod-Proteinkomplexes.

Reagenzien:

Enzymobead^R-Reagenz von BIORAD Chemical Division

β -D-Glukose 1 %

0,2 M Phosphat Puffer pH 7,2

10 µl \Leftrightarrow 80 ng humanes Angiogenin (hergestellt aus rekombinanten Baby-Hamster-Nieren-Zellen) in wässriger Lösung 8 µg/ml
1,0 mCi Na¹²⁵J

Jodierung:

1. Rehydriere das Enzymobead^R-Reagenz durch Zugabe von 50 µl aqua dest. mindestens 1 Stunde vor dem Gebrauch. Lagerung bei 4° C.
2. Stelle eine β-D-Glucoselösung 1 % her.
3. Pipettiere zum gelösten Enzymobead^R-Reagenz:

0,2 M Phosphat Puffer pH 7,2	50 µl
Wässrige Angiogeninlösung 8µg/ml	10 µl
1,0 mCi Na ¹²⁵ J	10 µl
β-D-Glukose 1 %	25 µl
4. Mische die Reagenzien. Die Jodierung verläuft bei Zimmertemperatur in ca. 25 min. Zur Entfernung des Enzymobead^R-Reagenz zentrifugiere für 10 min. bei 1000 x g und dekan-tiere den Überstand sofort. Trage den Überstand zur weiteren Separation auf eine Bio-Gel^R P-6DG Gelfiltrationssäule auf.
5. Die Fraktionen, die mehr als 10 % der Gesamtradioaktivität enthalten, werden gepoolt. Ein äquivalentes Volumen Hühnereialbumin (10 mg/ml) wird zur stabilen Lagerbarkeit hinzugefügt.
6. Das ¹²⁵J-Angiogenin wird in 400 µl Portionen in bleigeschützten Gefäßen bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

c) Versuchsanordnung zur Bindung von ¹²⁵J-Angiogenin an 6x0 ePTFE-Fäden

1. Bindung von ¹²⁵J-Angiogenin hergestellt nach der Chloramin-T-Methode:

¹²⁵J-Angiogenin 1,68 µg/ml (Standard nach Chloramin-T-Methode)

Aus dem Standard wird eine Verdünnungsreihe hergestellt mit ¹²⁵J-Angiogenin-Konzentrationen von 8,4 ng/ml, 16,8 ng/ml, 42 ng/ml, 84 ng/ml und 168 ng/ml.

1cm lange Collagen I-beschichtete 6x0 ePTFE-Fäden werden 24 Std. in 0,2 ml der jeweiligen ¹²⁵J-Angiogeninlösung aus der Verdünnungsreihe bei Raumtemperatur eingelegt, so daß der Faden im 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß vollständig in die Angiogeninlösung eintaucht. Nach 24 Std. wird die ¹²⁵J-Angiogeninlösung entfernt und der PTFE-Faden 4x mit 0,2 ml HBSS gespült.

Die PTFE-Fäden werden in 10 ml Chem-Tubes plaziert, 1 ml HBSS hinzupipettiert und 5 min. bei 5000 x g zentrifugiert.

Alle Proben werden in einem γ-Zähler (Micromedic 4/600 plus Automatic Gamma Counter) gemessen. Die gemessene γ-Aktivität wird als IPM angegeben. Als Referenzproben dienen 0,2 ml der jeweiligen ¹²⁵J-Angiogeninlösung aus der Verdünnungsreihe plus 1 ml HBSS in 10 ml Chem-Tubes, 5 min. bei 5000 x g zentrifugiert. Deren gemessene Aktivität wird als 100 %-Referenzwert zugrundegelegt.

2. Bindung von ^{125}J -Angiogenin hergestellt nach der Enzymobead^R-Reaktion:

^{125}J -Angiogenin 8 $\mu\text{g/ml}$ (Standard nach Enzymobead^R-Reaktion)

Aus dem Standard wird eine Verdünnungsreihe hergestellt mit ^{125}J -Angiogenin-Konzentrationen von 100 ng/ml, 200 ng/ml, 500 ng/ml und 1000 ng/ml.

Die weiteren Versuchsschritte entsprechen dem unter Jodierung mit der Chloramin-T-Methode im vorhergehenden Absatz beschriebenen Verfahren.

4.3.1.3 Tierversuch

Versuchstiere:

65 männliche Lewis Inzuchtratten (Gewicht: 300–350 g, Alter: ca. 10 Wochen) wurden von der Charles River Company in Massachusetts/USA bezogen. Alle Tiere wurden unter einem regelmäßig 12-stündlich wechselnden Tages-Nachtrhythmus gehalten. Die Ratten konnten Futter und Wasser nach Belieben zu sich nehmen. Vor Versuchsbeginn wurde den Tieren eine Aklimatisationszeit an die neue Umgebung von 7 Tagen gewährt.

Vorbereitung der Versuchstiere:

Zur Narkotisierung der Tiere wurde Ketamin-HCl 40 $\mu\text{g/kg}$ Körpergewicht intramuskulär (Ketaset von Aveco Co.) und Acerpromazin-Maleat 1 $\mu\text{g/kg}$ Körpergewicht intramuskulär (von TechAmerica) gegeben. Alle Tierexperimente wurden unter strikter Beachtung der Richtlinien für Tierexperimente der Harvard-Universität in Boston/MA und des National Institutes of Health durchgeführt. Die Zuordnung der Tiere zu den einzelnen Versuchsgruppen erfolgte zufällig.

In Narkose wurde das Abdomen einschließlich beider Leistenregionen der Tiere mit einem Elektrorasierer vom Fell befreit. In Rückenlage wurden die Tiere auf eine Korkplatte an Vorder- und Hinterläufen mit gepolsterten Gummibandagen fixiert. Die geschorene Haut im Bereich der Op.-Felder wurde desinfiziert durch 3-maliges Abwaschen mit einer Jodlösung.

Antibiotikaprophylaxe:

Direkt vor Beginn des chirurgischen Eingriffes erhielt jedes Tier eine Einzeldosis von 10 $\mu\text{g/g}$ Körpergewicht Ampicillin (Polyflex der Fa. Bristol Lab.) intraperitoneal.

Chirurgisches Vorgehen:

Alle chirurgischen Präparationen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zur Induktion der Ischämie in den Rattenhinterbeinen wurde eine longitudinale Hautinzision in

beiden Leistenregionen durchgeführt. Die Femoralarterie wurde dargestellt und freipräpariert, ohne die benachbarten Strukturen (Venen, Nerven) zu tangieren (ABB. 1).

Auf einer Länge von 1 cm wurde die Femoralarterie, einschließlich der Aufgabelung in die Arteria profunda femoris, reseziert. Unter Ligatur der Gefäßstümpfe mit 4x0 Seidenfäden (Fa. Ethicon) und Einknoten eines 1 cm langen präparierten ePTFE-Fadens wurde der Defekt überbrückt unter sorgfältiger Vermeidung von Blutungen (ABB. 2). Beendet wurde die Operation mit dem Wundverschluß, der mit einer fortlaufenden atraumatischen 4x0 Prolene-Naht (Fa. Ethicon) durchgeführt wurde.

4.3.1.4 Auswertung

Gewebepräparation:

7, 14, 28, 42 und 70 Tage nach dem chirurgischen Eingriff wurden die Ratten der jeweiligen Gruppe (4 Ratten = 8 Beine in der jeweiligen Kontrollgruppe, 4 Ratten = 8 Beine in der Collagen I Gruppe und 5 Ratten = 10 Beine in der Angiogeningruppe) erneut narkotisiert und eine Längslaparotomie mit Freipräparation der abdominalen Aorta durchgeführt. Die abdominale Aorta wurde dann mit einer 23G Butterfly-Kanüle punktiert und die in der abdominellen Aorta einliegende Nadel über eine Ligatur fixiert. Nach Gabe einer letalen Dosis Ketamin direkt intrakardial wurden 50 ml einer 10 %-igen Phosphat-gepufferten Formalinlösung (Fisher Scientific) über die in der abdominellen Aorta einliegende Butterfly-Kanüle unter einem kontinuierlichen Druck von 100 mm Hg über einen Zeitraum von 30 Minuten mittels Perfusor infundiert. Der Rückstrom in die thorakale Aorta und die oberen Abdominalorgane wurde durch Ligatur der abdominellen Aorta direkt kranial der einliegenden Butterfly-Kanüle verhindert. Das fixierte Gewebe aus beiden Ratten Oberschenkeln wurde en bloc in Form eines Gewebszylinders von 1,5 x 0,5 cm um den implantierten 1 cm langen 6 x 0 PTFE-Faden entnommen. Jeder Gewebszylinder wurde orthograd in 3 verschiedenen Ebenen (proximal, medial und distal) mikroskopisch geschnitten und in Paraffinwachsböcke eingebettet.

Die Standardfärbung der Präparate erfolgte mit Hämatoxylin-Eosin zur lichtmikroskopischen Untersuchung. Resorchin- van Gieson- Färbungen wurden von zusätzlich geschnittenen Präparaten angefertigt.

Mikroskopie und Dokumentation:

Die Auswertung der Präparate erfolgte als quantitative Bestimmung der Gefäße mit Hilfe eines Leitz- Lichtmikroskopes (Orthoplan) bei 100- facher Vergrößerung. Die ABB. 4A zeigt ein mikroskopisches Präparat aus der Kontrollgruppe 07 Tage nach der erzeugten Ischämie und der Implantation eines 1 cm langen 6x0 ePTFE-Fadens. Die Auszählung erfolgte durch Projektion eines metrischen Gitternetzes auf das jeweilige zu untersuchende Präparat. Der mikroskopische Bildausschnitt wurde bei dem jeweiligen Präparat auf den orthograd angeschnittenen 6x0 PTFE-Faden zentriert (siehe ↓ in ABB. 4A). Alle angeschnittenen Gefäße mit einem Durchmesser zwischen 5 µm und 300 µm, die die in der TABELLE 1 aufgelisteten Kriterien für eine Gefäßstruktur erfüllten, wurden innerhalb eines Radius $r = 0.575 \text{ mm}$

(entspricht dem 2,5-fachen Durchmesser des 6x0 ePTFE-Fadens $d = 0,23 \text{ mm}$) um den zentrierten Faden ausgezählt.

Die ausgezählte Kreisfläche beträgt: $\pi \times r^2 = 1,04 \text{ mm}^2$ (*Formel 1*).

Die Fläche gewebefreier Planquadrate des Gitternetzes wurde als Leerfläche von der ausgezählten Gesamtfläche abgezogen.

1. Durchmesser $> 5 \text{ }\mu\text{m}$ (obligat)
2. Endothelzellähnliche innere Gefäßauskleidung (obligat)
3. Intraluminal verbliebene rote Blutkörperchen (optional)

TABELLE 1:

Identifikationskriterien für eine Gefäßstruktur am mikroskopischen Präparat.

Jedes mikroskopische Präparat wurde 2x ausgezählt bei einer tolerierten Abweichung $\leq 10 \%$. Die gezählten Gefäße wurden entsprechend ihrem Durchmesser 4 Klassen zugeordnet. Die Klasseneinteilung erfolgte wie in TABELLE 2 dargestellt:

- | | |
|-----------|--|
| Kategorie | 1: Kapillaren $5 - 10 \text{ }\mu\text{m}$ |
| | 2: Präkapillaren $> 10 - 50 \text{ }\mu\text{m}$ |
| | 3: Arteriolen $> 50 - 150 \text{ }\mu\text{m}$ |
| | 4: Kleine Arterien $> 150 - 300 \text{ }\mu\text{m}$ |

TABELLE 2:

Klassifizierung und Einteilung der Gefäße in Anlehnung an Hudlicka et Tyler, (1984); Lash et Bohlen, (1987) und Wiedeman, (1968).

Statistik:

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde mit einem IBM-kompatiblen PC der Scheffe'-Test (Anova SAS) verwendet, weil er auch bei Stichproben mit ungleichem Stichprobenumfang anwendbar ist. Als Testvoraussetzungen gelten die Unabhängigkeit der Stichproben und die Normalverteilung der Zufallsvariablen in den einzelnen Gruppen. Bei der Untersuchung handelt es sich um eine dreifaktorielle Varianzanalyse mit insgesamt 15 verschiedenen Faktorstufen:

Stufe 01–05: Angiogeningruppe	07, 14, 28, 42 und 70 Tage nach OP.
Stufe 06–10: Collagengruppe	07, 14, 28, 42 und 70 Tage nach OP.
Stufe 11–15: Kontrollgruppe	07, 14, 28, 42 und 70 Tage nach OP.

Merkmal (Variable) war die Gefäßdichte (Anzahl/mm²) der Kapillaren, Präkapillaren, Arteriolen und kleinen Arterien.

Das Signifikanzniveau α für den Fehler 1. Art wurde mit 5 % (Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$) festgelegt.

Es wurden jeweils Paarvergleiche zwischen den 15 Faktorstufen durchgeführt. Ziel der Analyse war, den Einfluß der 15 Faktorstufen auf das Merkmal Gefäßdichte zu prüfen.

4.3.2 Ergebnisse

Bei der Beschichtung der ePTFE-Fäden mit Collagen I als Matrixfaktor und Angiogenin als angiogenetischem Faktor nach der oben genannten Methode (Abschnitt 4.3.1.1) blieb die biologische, angiogenetische Potenz und Aktivität der Faktoren erhalten, wie die erhaltene Fähigkeit zur Induktion und Stimulierung der Angiogenese im CAM-Assay und Kaninchenkorneatest eindeutig zeigte.

¹²⁵J-Angiogeninbindung an ePTFE:

Die Bindung von Angiogenin an Collagen I-beschichtete ePTFE-Fäden wurde mit ¹²⁵J-Angiogenin bestimmt. Die Bindungskurven von ¹²⁵J-Angiogenin sind in der ABB. 3A (Chloramin T-Methode) und in der ABB. 3B (Enzymobead^R-Reaktion) dargestellt. Dabei erwies sich die Jodierung von Angiogenin mit der Enzymobead^R-Reaktion als schonender aber dafür weniger effektiv im Vergleich zur Jodierung nach der Chloramin T-Methode. Bei einer Angiogeninkonzentration von 131,5 ng/ml in der Coating-Lösung wurden nach der Bestimmung mit der Chloramin T-Methode 1,9 ng Angiogenin pro cm 6x0 ePTFE-Faden adsorbiert. Nach der Enzymobead^R-Reaktion betrug die Bindung von Angiogenin nur 0,9 ng pro cm 6x0 ePTFE-Faden. Die Vorbehandlung der ePTFE-Fäden mit Äthanol zur Erhöhung der Hydrophilie von PTFE vor der Beschichtung mit Collagen I und Angiogenin zeigte bei Angiogeninkonzentrationen der Coating-Lösung >200 ng/ml sogar eine geringere Bindung von Angiogenin an PTFE (ABB. 3B), als die nicht mit Äthanol vorbehandelten PTFE-Fäden.

Klinischer Verlauf:

Alle 65 operierten Ratten erholten sich schnell von der Narkose und der Operation. Trotz der initial erheblichen Ischämie im Bereich der Rattenhinterläufe traten bei keinem der Tiere Wundheilungsstörungen oder Nekrosen auf. Alle OP-Wunden verheilten primär. Bei keinem der Tiere wurde im Bereich der Rattenhinterbeine eine Parese oder eine Plegie beobachtet. 4–6 Stunden nach der Operation hatten sich alle Tiere soweit erholt, daß sie sich normal bewegten und ein unauffälliges Verhalten zeigten. Alle Tiere erlebten den vorbestimmten Zeitpunkt des Versuchsendes (reichend von 07 bis 70 Tage nach Induktion der Ischämie) bei guter allgemeiner Gesundheit und normalem Verhalten.

Mikroskopie:

In den ABB. 4–9 sind exemplarisch mikroskopische Präparate der angefertigten histologischen Schnitte bei 100-facher Vergrößerung fotografiert. Die poröse Struktur des PTFE-Fadens ist sehr gut zu erkennen (ABB. 4, 5). Ein Vergleich der beiden verwendeten Färbemethoden (Hämatoxylin-Eosin, Resorchinfuchsin- van Gieson) ergab keine für die Auswertung bedeutsamen Unterschiede (ABB. 4, 5). Beide Färbungen ermöglichten ein eindeutiges Identifizieren der Gefäßstrukturen, wie die Abbildungsbeispiele (ABB. 4–9) zeigen. Beim Schneiden und Fixieren der Präparate traten vereinzelt Artefakte auf. Gewebeverbände lösten sich voneinander (ABB. 4C). Teilweise faltete sich das PTFE auf der Schnittfläche ein (ABB. 6A, 8). Die Gefäßstrukturen ließen sich gut anhand der in der TABELLE 1 und 2 aufgelisteten Kriterien identifizieren und kategorisieren. Vereinzelt fanden sich in den Gefäßlumina noch Erythrozyten (ABB. 4C).

Quantitative Resultate:

Von den 130 Gewebeproben wurden 390 mikroskopische Präparate angefertigt. 72 % der 390 mikroskopischen Präparate ($N = 281$) konnten ausgezählt und statistisch ausgewertet werden. Bei den fehlenden 28 % war eine Auswertung nicht möglich, weil entweder der PTFE-Faden im mikroskopischen Präparat nicht zu orten war (17 %), zu wenig Gewebe im Schnittpräparat vorhanden war (7 %), oder technische Mängel (4 %) eine Beurteilung des Präparates nicht zuließen. Die Mittelwerte der ausgezählten Gefäße (Gesamtzahl, Kapillaren, Präkapillaren) sind in der TABELLE 3 zusammengestellt. Die Gesamt-Gefäßdichte von $144/\text{mm}^2$ in der Angiogeningruppe (Beschichtung: Collagen I + 1,9 ng Angiogenin) 07 Tage nach Erzeugung der Ischämie war nach dem Scheffe'-Test signifikant höher ($p \leq 0,05$) gegenüber allen Kontrollgruppen (unbeschichteter PTFE-Faden), der Collagengruppe (Collagen-beschichteter PTFE-Faden) 14 und 42 Tage nach Erzeugung der Ischämie und der Angiogeningruppe 14 und 42 Tage nach Erzeugung der Ischämie (TABELLE 3; ABB. 10). Die Zahl der Kapillaren/ mm^2 in der Angiogeningruppe 07 Tage nach Erzeugung der Ischämie ($N_k = 78/\text{mm}^2$) war nach dem Scheffe'-Test signifikant höher ($p \leq 0,05$) im Vergleich zu der Kapillardichte in allen anderen Gruppen (TABELLE 3; ABB. 11). Alle anderen Vergleiche zwischen den Gruppen zeigten nach dem Scheffe'-Test keine statistisch signifikanten Unterschiede. In der Gruppe der Präkapillaren war die Varianz so groß, daß eine statistische Aussage nicht möglich war. Die Anzahl der Arteriolen und der kleinen Arterien wurde aufgrund ihrer geringen Anzahl in den Präparaten statistisch nicht ausgewertet. In der ABB. 12 wurde das Verhältnis von Kapillaren/Präkapillaren in Prozent dargestellt. Als 100 % Bezugswert diente die Gesamtgefäßanzahl/ mm^2 in der jeweiligen Gruppe:

Beispiel 1

Angiogeningruppe 07 Tage nach Ischämieinduktion: Gesamtgefäßanzahl $144/\text{mm}^2 = 100 \%$, Kapillaren $78/\text{mm}^2 = 54,17 \%$, Präkapillaren $65/\text{mm}^2 = 45,14 \%$ (ABB. 12);

Beispiel 2

Collagengruppe 28 Tage nach Ischämieinduktion: Gesamtgefäßanzahl $101/\text{mm}^2 = 100 \%$, Kapillaren $27/\text{mm}^2 = 26,73 \%$, Präkapillaren $73/\text{mm}^2 = 72,28 \%$ (ABB. 12).

In der ABB. 13 sind die Kapillaren pro mm^2 bzw. die Anzahl der Präkapillaren pro mm^2 graphisch dargestellt.

Tage Post OP	Kontrollen Gefäße pro mm^2			Collagen Gruppen Gefäße pro mm^2			Angiogenin Gruppen Gefäße pro mm^2		
	Gesamt	Kapil- laren	Präkapil- laren	Gesamt	Kapil- laren	Präkapil- laren	Gesamt	Kapil- laren	Präka- pil-laren
07	84	25	59	123	36	87	144*	78**	65
14	97	39	52	95	31	62	61	24	35
28	67	31	35	101	27	73	130	45	83
42	78	33	45	81	20	60	96	38	56
70	96	38	56	100	19	79	136	41	93

TABELLE 3:

Mittelwerte der Gesamtgefäßzahl, der Präkapillaren und der Kapillaren pro mm^2 in den einzelnen Versuchsgruppen 07–70 Tage nach Induktion einer Ischämie im Bereich der Rattenhinterläufe. In den Kontrollgruppen wurden 1cm lange unbehandelte 6x0 PTFE-Fäden implantiert. In den Collagengruppen waren die PTFE-Fäden mit Collagen I beschichtet und in den Angiogeningruppen waren die 1cm langen PTFE-Fäden mit Collagen I und zusätzlich 1,9 ng Angiogenin beschichtet.

- * – Die Gesamt-Gefäßdichte von $144/\text{mm}^2$ in der Angiogenin-Gruppe 07 Tage nach Erzeugung der Ischämie war nach dem Scheffe'-Test signifikant ($p \leq 0,05$) gegenüber allen Kontrollgruppen, der Collagengruppe und der Angiogeningruppe, jeweils 14 und 42 Tage nach Erzeugung der Ischämie.
- ** – Die Zahl der Kapillaren/ mm^2 in der Angiogeningruppe 07 Tage nach Erzeugung der Ischämie war nach dem Scheffe'-Test signifikant höher ($p \leq 0,05$) im Vergleich zu der Kapillardichte in allen anderen Gruppen.

4.3.3 Diskussion

Wie die Untersuchungen zur Bindungsfähigkeit von ^{125}J -Angiogenin an Collagen I-beschichtete PTFE-Oberflächen (ABB. 3A + B) zeigen, verläuft die Bindungskurve von Angiogenin über einen weiten Konzentrationsbereich weitgehend linear. Dies trifft zu, sowohl für das ^{125}J -Angiogenin, dem mit der Chloramin-T-Methode molekulares Jod angelagert wurde, als auch für die enzymatische Anlagerung molekularen Jods mit der Enzymobead^R-Reaktion. Überraschend war die insgesamt sehr niedrige Bindung von Angiogenin an die mit dem Matrixfaktor Collagen I beschichteten PTFE-Fäden. Hierzu konnte bisher keine schlüssige Erklärung gefunden werden. Angiogenin ist sehr gut lösbar und stabil in wässrigen Lösungen. Allgemein hat es eine große Tendenz, sich an Oberflächen anzulagern (z. B. Glas, Polyäthylen, Polypropylen, Polystyren), wie eigene Untersuchungen zeigten. Deshalb ist die Lagerung von Angiogenin in wässriger Lösung nur in hoher Konzentration (Proteinkonzentration $> 1 \text{ mg/ml}$) sinnvoll, weil sich sonst ein beträchtlicher Teil des Angiogenins an der Wand des Aufbewahrungsgefäßes absetzt und haften bleibt, wie Adsorptions-Untersuchungen mit ^{125}J -Angiogenin an verschiedenen Oberflächen zeigten. Expandiertes PTFE ist ein poröses Material mit einer hydrophoben Oberfläche, wobei die Porosität von der Fibrillenlänge der Fasern (zwischen 20 und $90 \mu\text{m}$) abhängt. Je länger die Fibrillenlänge desto höher die Porosität (Kogel et al., 1989). Eine Vorbehandlung mit Alkohol führt zu einer Erhöhung der Hydrophilie von PTFE und verbessert die Biokompatibilität (Trudell et al., 1978; Stronck et al., 1992). Bei der guten Wasserlöslichkeit von Angiogenin sollte eine bessere Angiogeninbindung an Alkoholvorbehandeltes PTFE resultieren. Die Bindungskurve für ^{125}J -Angiogenin an Äthanol vorbehandeltes PTFE (ABB. 3B) zeigt, daß bei hohen Angiogeninkonzentrationen sogar ein gegenteiliger Effekt auftrat. Die Bindung für ^{125}J -Angiogenin war geringer als bei unbehandeltem PTFE. Die Aufbringung des Matrixfaktors Collagen I, der zumindest eine Verbesserung der Biokompatibilität der PTFE-Oberfläche erwarten ließ, zeigte keinen positiven Effekt für die Adsorption von Angiogenin. Dies ist umso erstaunlicher, als Collagen I für viele Angiogenesefaktoren, die in der extrazellulären Matrix gelagert und wahrscheinlich auch gebunden sind, eine gute Trägersubstanz abgibt. Wie neuere Untersuchungen inzwischen gezeigt haben, ist extrazelluläres Angiogenin in der Matrix und an der Endothelzelloberfläche an Aktin gebunden (Hu et al., 1993).

Trotz Minimierung der interindividuellen genetischen Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren im Versuchskollektiv durch ausschließliche Verwendung männlicher Ratten gleichen Gewichtes und damit auch ungefähr gleichen Alters aus ein und demselben Inzuchtstamm zeigte sich, daß die Varianz der untersuchten Merkmale in den einzelnen Gruppen teilweise erheblich war. Trotzdem ließen sich Unterschiede feststellen, die teilweise sogar statistisch signifikant sind. Bereits $1,9 \text{ ng}$ lokal applizierten Angiogenins bewirkten in den ischämischen Rattenhinterläufen 07 Tage nach Ischämieinduktion eine erhebliche Steigerung der Gesamtgefäßanzahl und der Kapillaren pro mm^2 (ABB. 11, 12, TABELLE 3). Die Entwicklung der Gesamtgefäßzahl/ mm^2 07–70 Tage nach Ischämiebeginn in den ABB. 10, 11 und 12 läßt erkennen, daß in den Angiogeningruppen bis auf die Gruppe 14 Tage nach Ischämiebeginn die Gesamtzahl der Gefäße/ mm^2 im Vergleich zur jeweiligen Kontroll- und Collagengruppe sichtlich größer ist. Statistisch signifikant (Scheffe'-Test, $p \leq 0,05$) war die Gesamtzahl der Gefäße pro mm^2 nur in der Angiogeningruppe 07 Tage nach Erzeugung der Ischämie gegen-

über allen Kontrollgruppen (unbeschichteter PTFE-Faden), den Collagengruppen (Collagen beschichteter PTFE-Faden) und den Angiogeningruppen 14 und 42 Tage nach Erzeugung der Ischämie (TABELLE 3; ABB. 10).

Die angiogenetische Antwort auf den Ischämieereiz war in der Collagengruppe deutlich schwächer als in der Angiogeningruppe. In der Kontrollgruppe war die angiogenetische Antwort auf den Ischämieereiz am schwächsten und auch deutlich zeitverzögert. Somit scheint Angiogenin initial (07 Tage nach Ischämiebeginn) eine kräftige Angiogenese zu induzieren, obwohl die applizierte Dosis, von lokal 1,9 ng Angiogenin auf einer Collagenmatrix, als gering zu bezeichnen ist. Warum aber nach 14 Tagen in der Angiogeningruppe ein so drastischer Abfall der Gesamtgefäßzahl zu beobachten war, darüber läßt sich nur spekulieren. Denkbar ist, daß die Wirkung der 1,9 ng Angiogenin 14 Tage nach Ischämieinduktion durch enzymatischen Abbau oder biologische Inaktivierung verschwunden ist. Bisher liegen jedoch noch keine Untersuchungen über die biologische und molekulare Halbwertszeit von Angiogenin in vivo vor. Im Vergleich zu den Kontrollen fand auch in den Collagengruppen, besonders 07 und 28 Tage nach Ischämiebeginn eine vermehrte Angiogenese statt (ABB. 10, 11, 12). Als Tendenz zeichnet sich ab, daß in der Angiogeningruppe der stärkste Schub zur Gefäßneubildung bereits 07 Tage nach Ischämiebeginn eintrat. Er war deutlich ausgeprägter, als in der Collagengruppe. In beiden Gruppen war die Angiogenese überschießend, denn 14 Tage nach Ischämiebeginn kam es in beiden Gruppen zu einem deutlichen Abfall der Anzahl an Gefäßen. Ein denkbarer Mechanismus könnte sein, daß ein endothelialer Zellmembranrezeptor zunächst hochreguliert wird, möglicherweise durch Expression an der äußeren Zelloberfläche (Externalisation) mit anschließender überschießender Gegenregulation (down regulation) dargestellt in ABB. 12.

Im Gegensatz dazu zeichnet sich in der Kontrollgruppe ein nur leichter Angiogeneseschub ab, der erst 14 Tage nach Induktion der Ischämie begann. Die Gesamtzahl an Gefäßen in der Kontrollgruppe war 28 Tage nach Ischämiebeginn wieder rückläufig, um danach 42 und 70 Tage nach Ischämiebeginn langsam aber stetig wieder anzusteigen (ABB. 10, 11). Die im Vergleich zur Kontrollgruppe schnellere und stärkere Induktion der Angiogenese in der Collagengruppe könnte ein Hinweis dafür sein, daß durch das Beschichten des PTFE-Fadens mit der Matrixsubstanz Collagen der Angiogenese quasi eine Leitstruktur mit hoher Speicherkapazität für Angiogenesefaktoren vorgegeben wird. Dadurch könnte die durch die Ischämie induzierte zielgerichtete Gefäßneubildung in der Collagengruppe gegenüber den Kontrollen beschleunigt sein. In der Collagen- und in der Angiogeningruppe kam es 28 Tage nach Ischämiebeginn erneut zu einem Anstieg der Gesamtgefäßzahl, der in der Angiogeningruppe deutlich akzentuierter als in der Collagengruppe ausfiel. In der Angiogeningruppe setzen sich die überschießenden Pendelbewegungen, wenn auch mit abnehmender Frequenz und abnehmender Amplitude, fort. Eine phasengleiche Regulation in abgeschwächter Form (mit geringerer Amplitude) läßt sich in der Collagengruppe ableiten. Die Gesamtgefäßanzahl/mm² war in den Collagengruppen abgesehen vom Zeitpunkt 14 Tage nach Ischämiebeginn deutlich niedriger als in der Angiogeningruppe (ABB. 11).

Eine Aufschlüsselung der gezählten Gefäße in Kapillaren, Präkapillaren, Arteriolen und kleine Arterien gemäß den Kriterien in der TABELLE 2 ist in der ABB. 11 für die Kontroll-

gruppen, für die Collagengruppen und für die Angiogeningruppen jeweils für den Zeitraum 07–70 Tage post Ischämiebeginn aufgezeigt. In der Kontrollgruppe zeigte sich ein schwacher angiogenetischer Schub mit der Bildung neuer Kapillaren erst 14 Tage nach Ischämiebeginn. 07 Tage nach Ischämiebeginn scheint der Hauptmechanismus in der Kontrollgruppe (ABB. 11, 12) zur Kompensation der Ischämie in der Erweiterung präformierter Kapillaren zu Präkapillaren zu bestehen. Bei der niedrigsten Gesamtgefäßanzahl 07 Tage nach Ischämiebeginn war in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Angiogeningruppe (ABB. 11, 12) eine unverhältnismäßig hohe Zahl an Präkapillaren bei geringer Anzahl an Kapillaren anzutreffen. Eine Woche später war eine Neubildung von Kapillaren auch in der Kontrollgruppe nachweisbar (ABB. 11, 12). In der Collagengruppe war der Anteil an Präkapillaren ebenfalls hoch, bei geringerer Gesamtgefäßanzahl im Vergleich zur Angiogeningruppe (ABB. 11, 12). Verfolgt man die Anzahl der Kapillaren in der Collagengruppe über den gesamten Zeitabschnitt 07–70 Tage nach Ischämiebeginn (ABB. 12), so nahm ihre Anzahl leicht aber kontinuierlich ab. Wesentliche Veränderungen ließen sich lediglich für die Präkapillaren nachweisen. Hier zeigte sich die bereits für die Gesamtgefäßanzahl beobachtete gedämpfte Pendelbewegung mit leicht ansteigender Tendenz der Zahl an Präkapillaren bis zum 70. Tag (ABB. 12).

In der ABB. 12 läßt sich die Zahl der Kapillaren in den einzelnen Gruppen gut verfolgen. Für die Angiogeningruppe ist die gedämpfte Pendelbewegung der Gesamtgefäßzahl phasengleich, aber abgeschwächt bei der Kapillaranzahl wiederzuerkennen. Zieht man die Präkapillaren in die Betrachtungen mit ein, so zeigt sich diese Pendelbewegung verstärkt. Angiogenin stimulierte somit primär, bis 07 Tage nach Ischämiebeginn die Kapillarbildung, während im weiteren zeitlichen Verlauf eine in Pendelbewegungen verlaufende Stimulation der Präkapillaren in den Vordergrund trat. Ob dies durch eine Erweiterung vorhandener und/oder neugebildeter Kapillaren erfolgte, ist anhand dieser Versuche nicht zu klären. Unter Mitberücksichtigung, daß die Angiogenese ein komplexer, viele Faktoren involvierender Vorgang ist, setzen sich viele Effekte aus der Interaktion mehrerer Prozesse und Faktoren miteinander zusammen. Auffallend war, daß in der Collagengruppe im Zeitverlauf die Anzahl an Kapillaren sogar leicht abnahm und unter die Werte in den Kontrollen absank (ABB. 12). Die Kapillarbildung scheint gehemmt zu sein, oder ist zugunsten der Präkapillaren verschoben. Da Angiogenesefaktoren unterschiedlich an Collagen in der extrazellulären Matrix angelagert werden, ist es denkbar, daß sich das Gleichgewicht der interagierenden Faktoren zugunsten einer rascheren Bildung von Präkapillaren aus Kapillaren veränderte. Im Zeitraum 07–70 Tage nach Ischämie fand sich die langsamste und schwächste angiogenetische Reaktion auf den ischämischen Reiz bei den Kontrollgruppen. Erst nach 70 Tagen erreichte die Anzahl an Kapillaren in der Kontrollgruppe fast die Werte der Angiogeningruppe (ABB. 12). In der Kontrollgruppe lag die Anzahl der Präkapillaren auch nach 70 Tagen deutlich unter derjenigen der Angiogenin- aber auch der Collagengruppe (ABB. 12).

Betrachtet man die relativen Proportionen von Kapillaren/Präkapillaren im Zeitverlauf in den einzelnen Gruppen (ABB. 13), so läßt sich erkennen, daß in der Angiogeningruppe initial nach 07 Tagen die Proportionen massiv zugunsten der Kapillaren verschoben waren. Die Kapillarneubildung war – wahrscheinlich Angiogenin bedingt – überschießend, wie die weitere Entwicklung der Relation in der Angiogeningruppe zeigte. In der Collagengruppe war die Relation Kapillaren/Präkapillaren über die ganze Zeitperiode im wesentlichen konstant

(ABB. 13). In der Kontrollgruppe ließ sich bis zum 28 Tag post OP eine Verschiebung der Relation zugunsten der Kapillaren feststellen (ABB. 13), die sich danach wieder zugunsten der Präkapillaren verschob. Insgesamt waren in der prozentualen Relation deutlich mehr Präkapillaren als Kapillaren vorhanden, ausgenommen die Angiogeningruppe 07 Tage nach Ischämieinduktion. Bei der guten, natürlich vorgegebenen Kollateralisation bei Ratten im Bereich der Hinterläufe und in Berücksichtigung des blanden und unauffälligen klinischen Verlaufs der Tiere in allen Gruppen ist eine fortbestehende milde Ischämie als Ursache einer permanenten Erweiterung der Kapillaren zu Präkapillaren nicht zu begründen. Durch die Resektion der A. femoralis und deren Ersatz durch einen PTFE-Faden wurde eine Ischämie im wesentlichen distal der Resektionsstelle gesetzt. Nach Abklingen der angiogenetischen Wirkung des lokal eingebrachten Angiogenins, das die um den PTFE-Faden stattfindende Angiogenese massiv zugunsten der Kapillaren verschoben hatte, ist denkbar, daß die angiogenetische Reaktion im weiteren Verlauf zugunsten besserer Flußbedingungen zu größeren, kaliberstärkeren Präkapillaren modifiziert wurde, um einen besseren Bluttransport zu den distal gelegenen ischämischen Geweben zu gewährleisten.

Trägt man die Anzahl der Gefäße pro mm² in den einzelnen Gruppen gegen die Zeit 07–70 Tage nach Ischämieinduktion in ein Koordinatensystem ein, so scheint die Regulation der Angiogenese einer gedämpften Sinusschwingung um den Regelwert (Sollwert) zu entsprechen (ABB. 12). Je stärker die Stimulation der Angiogenese, desto größer die Amplitude der Schwingung und desto größer auch die Frequenz der Schwingung, wie ein Vergleich der Kurven der Angiogeningruppen mit den Collagengruppen und den Kontrollgruppen zeigte (ABB. 12). Der Effekt des Angiogenins als Wachstumsfaktor besteht in einer frühen und starken Stimulation der Kapillarproliferation.

4.4 Untersuchung der Dosis-Wirkungsbeziehung von Angiogenin und basischem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF)

4.4.1 Material und Methoden

4.4.1.1 Applikation von Angiogenin/bFGF an PTFE

Eine sterile, wäßrige Lösung 1 %-iger Methylzellulose Ziffer 4000 (Fisher Scientific) wurde hergestellt. Menschliches Angiogenin hergestellt aus rekombinanten E. coli Bakterien (Hoechst AG) in wäßriger Lösung 3,8 mg/ml wurde mit der 1 %-igen Methylzellulose bei 4°C gemischt unter Herstellung von Lösungen mit einer Endkonzentration von Angiogenin von 1 mg/ml, 10 mg/ml, 100 mg/ml und 1000 mg/ml.

Menschlicher basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) hergestellt aus rekombinanten E. coli Bakterien (bezogen von R&D) 50 µg/ml in Phosphat-gepufferter Salzlösung PBS (von Whittaker), die 0,2 % Rinder-Serum-Albumin (RSA) enthielt (Sigma), wurde mit der 1 %-igen Methylzelluloselösung bei 4°C gemischt unter Herstellung von Endkonzentrationen von bFGF von 6,25 µg/ml, 12,5 µg/ml und 25 µg/ml.

1 cm lange 6 x 0 PTFE-Fäden, die mit Collagen I, wie bereits im Abschnitt 4.3.1.1 beschrieben, vorbeschichtet waren, wurden auf ein steriles Mylar Sheet (von LKB) plaziert. 10 µl einer der hergestellten Lösungen mit Angiogenin oder bFGF wurde in Tropfenform auf jeden Faden pipettiert. Für die Kontrollfäden wurde lediglich 1 %-ige Methylzellulose (10 µl) auf Collagen I-vorbeschichtete PTFE-Fäden in der gleichen Form aufgetragen. Nach 2-stündigem Trocknen bei Raumtemperatur unter sterilen Bedingungen in einer Laminar-Air-Flow Box unter ultraviolettem Licht war die Flüssigkeit verdunstet und die Methylzellulose als transparenter, flexibler Film an die 1 cm langen PTFE-Fäden gebunden. Der 1 cm lange PTFE-Faden wurde vorsichtig zusammen mit dem ihn umgebenden Methylzellulosefilm, der die angiogenetischen Faktoren enthielt, von der Plastikunterlage des Mylar Sheets gelöst und umgehend in die Rattenhinterläufe implantiert.

4.4.1.2 Tierversuch

Versuchstiere:

30 männliche Lewis Inzuchtratten (Körpergewicht: ≈ 200 g, Alter: ca. 6 Wochen) wurden von Charles River Company bezogen. Haltung und Akklimatisation der Tiere entsprachen dem im Abschnitt 4.3.1.3 beschriebenen Prozedere.

Die Vorbereitung der Versuchstiere, die durchgeführte Antibiotikaprophylaxe und das chirurgische Vorgehen entsprachen dem unter Abschnitt 4.3.1.3 beschriebenen Verfahren.

4.4.1.3 Auswertung

Gewebepräparation:

07 Tage nach dem chirurgischen Eingriff wurden die Ratten der jeweiligen Gruppe (2 Ratten = 4 Beine in der Kontrollgruppe, 4 Ratten = 8 Beine in der jeweiligen Angiogenin- bzw. bFGF-Gruppe) der Gewebepräparation nach der bereits im Abschnitt 4.3.1.4 beschriebenen Methode zugeführt. Die Färbung der Präparate erfolgte mit Hämatoxylin-Eosin nach Masson zur lichtmikroskopischen Untersuchung.

Mikroskopie und Dokumentation:

(Gleiches Procedere wie im vorherigen Versuch unter Abschnitt 4.3.1.4 beschrieben).

Statistik:

In jeder Gruppe wurde der Mittelwert X_m der ausgezählten Gefäße berechnet und als Gefäßdichte um den PTFE-Faden (Gefäße/mm²) dargestellt. Die Standardabweichung SD wurde für jede Gruppe berechnet (**Formel 2**).

Die erhaltenen Werte wurden auf statistische Relevanz unter Benutzung eines IBM-kompatiblen PC mit dem einseitigen Wilcoxon Rangfolge Summentest (Wilcoxon Rank Sum Test with one-tailed probability) untersucht. Diese statistische Methode wurde ausgewählt, weil eine Normalverteilung der Werte nicht angenommen werden konnte. Das Vertrauensintervall wurde mit $P < 0,05$ gewählt.

4.4.2 Ergebnisse:

Bei der Beschichtung der ePTFE-Fäden mit Collagen I als Matrixfaktor und – eingelagert in Methylzellulose – Angiogenin bzw. bFGF als angiogenetischem Faktor nach der oben genannten Methode (Absatz 4.4.1.1) blieb die biologische, angiogenetische Potenz und Aktivität der Faktoren erhalten, wie die erhaltene Fähigkeit zur Induktion und Stimulierung der Angiogenese im CAM-Assay und Kaninchenkorneatest eindeutig zeigte. Somit war eine Inaktivierung der Mitogene bei der Aufbereitung zur lokalen Applikation nicht eingetreten.

Klinischer Verlauf:

Alle 30 operierten Ratten erholten sich schnell von der Narkose und der Operation. Trotz der initial erheblichen Ischämie im Bereich der Rattenhinterläufe traten bei keinem der Tiere Wundheilungsstörungen oder Nekrosen auf. Alle OP-Wunden verheilten primär und bei keinem der Tiere wurde eine Parese oder eine Plegie beobachtet. 4–6 Stunden nach der Operation hatten sich alle Tiere soweit erholt, daß sie sich normal bewegten und ein unauffälliges Verhalten zeigten. Alle Tiere erlebten den vorbestimmten Zeitpunkt des Versuchsendes (07 Tage nach Induktion der Ischämie) bei guter allgemeiner Gesundheit und normalem Verhalten.

Histologische Präparate:

In den ABB. 14–22 sind exemplarisch mikroskopische Präparate der angefertigten histologischen Schnitte bei 100-facher Vergrößerung fotografiert. Die poröse Struktur des PTFE-Fadens ist sehr gut zu erkennen (ABB. 16). Beim Schneiden und Fixieren der Präparate traten vereinzelt Artefakte auf. Gewebeverbände lösten sich voneinander (ABB. 18, 20). Teilweise fiel das PTFE-Fadenmaterial aus der Schnittfläche heraus (ABB. 15, 17, 22). Alle Präparate wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die Gefäßstrukturen ließen sich gut anhand der in der TABELLE 1 und 2 aufgelisteten Kriterien identifizieren und kategorisieren. Vereinzelt fanden sich in den Gefäßlumina noch Erythrozyten (ABB. 19). In der ABB. 14A ist ein Präparat aus der Kontrollgruppe, in der ABB. 14B zum Vergleich ein Präparat aus der Angiogeningruppe (10 ng Angiogenin), jeweils 07 Tage nach induzierter Ischämie fotografiert, bei denen der PTFE-Faden nicht orthograd quer, sondern längs geschnitten wurde. Außer einer vermehrten Bindegewebsreaktion um den Angiogenin beschichteten PTFE-Faden in der ABB. 14B läßt sich eindeutig auch eine vermehrte Vaskularisation um den Faden im Vergleich mit dem Collagen beschichteten Faden (ABB. 14A) erkennen.

Quantitative Ergebnisse der histologischen Präparate:

Von den 60 Gewebeproben wurden 180 mikroskopische Präparate angefertigt. 158 (87,78 %) der 180 mikroskopischen Präparate konnten ausgezählt und statistisch ausgewertet werden. Bei den fehlenden 12,22 % war eine Auswertung nicht möglich, weil entweder der PTFE-Faden im mikroskopischen Präparat nicht zu orten war (5,1 %), zu wenig Gewebe im Schnittpreparat vorhanden war (4,12 %), oder technische Mängel (3 %) eine Beurteilung des Präparates nicht zuließen. Die Mittelwerte der jeweiligen Auszählungen sind in der TABELLE 4 dargestellt.

Gruppe	N	Mittelwert X_m (Gefäße/mm ²)	SD	Signifikanz
Kontrollen	4	349	9,69	
bFGF (62,5 ng)	8	292	62,27	NS
bFGF (125 ng)	8	365	21,31	NS
bFGF (250 ng)	8	489	18,28	**, P<0,002
ANG (10 ¹ ng)	8	367	15,30	*, P<0,046
ANG (10 ² ng)	8	447	90,24	**, P<0,002
ANG (10 ³ ng)	8	382	56,97	NS
ANG (10 ⁴ ng)	8	391	36,66	NS

TABELLE 4:

Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen der gezählten Gefäße pro mm² in den ischämischen Rattenhinterläufen 07 Tage nach OP. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Wilcoxon Rangfolge Test mit einseitiger Wahrscheinlichkeit (Wilcoxon rank sum test with one tailed probability). N = Anzahl Rattenhinterläufe pro Gruppe. SD = Standardabweichung. NS = nicht signifikant. * = signifikant (P < 0,05). ** = hoch signifikant (P < 0,01).

Es wurden alle Gefäße mit einem Durchmesser zwischen 5 und 300 µm ausgezählt. Der Mittelwert wurde in Gefäßquerschnitten/mm² angegeben. Die höchste Anzahl von Gefäßen pro mm² zeigte sich in der Gruppe von Ratten, die mit 250 ng bFGF behandelt wurden (489 Gefäße/mm²). Die zweithöchste Anzahl an Gefäßen wurde in der Gruppe von Ratten gefunden, die mit 100 ng Angiogenin behandelt wurden (447 Gefäße/mm²). Die Standardabweichung lag zwischen 9,69 (Kontrollgruppe) und 90,24 (100 ng Angiogeningruppe) und ist in TABELLE 4 und ABB. 23 dargestellt. Die statistische Auswertung durch den Wilcoxon Rank Sum Test bestätigte eine positive Reaktion mit vermehrter Gefäßneubildung bereits in der Gruppe von Ratten, die lediglich mit 10 ng Angiogenin im Vergleich zu den Kontrolltieren (P < 0,046) behandelt wurden. Trotz der geringen Anzahl von Tieren n = 4 (Gewebeproben n_G = 8) in jeder Gruppe und der bestehenden großen Differenzen in der individuellen Antwort auf die Ischämie zeigte sich eindeutig ein hochsignifikanter Anstieg der Gefäßneubildung (Neovaskularisation, Angiogenese) in den Tiergruppen, die mit 100 ng Angiogenin bzw. 250 ng bFGF im Vergleich zu den Kontrollgruppen (P < 0,002) behandelt worden waren. Bei den Tieren, die mit 62,5, bzw. 125 ng bFGF behandelt wurden, war kein signifikanter Anstieg der Gefäßneubildung im Vergleich zu den Kontrollgruppen festzustellen (P > 0,5; P < 0,092).

Auch große Mengen lokal applizierten Angiogenins (1.000 ng; 10.000 ng) zeigten keine statistisch signifikante Antwort im Sinne einer vermehrten Gefäßneubildung verglichen mit den Kontrolltieren ($P < 0,107$; $P < 0,055$), wie aus TABELLE 4 und ABB. 23 zu ersehen ist. Die prozentuale Verteilung der gezählten Gefäße entsprechend ihrem Gefäßdurchmesser in der jeweiligen Gruppe sind in der TABELLE 5 und in der ABB. 24 dargestellt. Als 100 % Bezugswert diente die Gesamtgefäßanzahl/mm² in der jeweiligen Gruppe:

Beispiel 1

10 ng Angiogeningruppe 07 Tage nach Ischämieinduktion: Gesamtgefäßanzahl 367/mm² = 100 %, Kapillaren 276/mm² = 75,3 %, Präkapillaren 90/mm² = 24,4 % (TABELLE 5, ABB. 24);

Beispiel 2

250 ng bFGF-Gruppe 07 Tage nach Ischämieinduktion: Gesamtgefäßanzahl 489/mm² = 100 %, Kapillaren 395/mm² = 80,8 %, Präkapillaren 91/mm² = 18,6 % (TABELLE 5, ABB. 24).

In der Gruppe der Tiere, die mit 250 ng bFGF behandelt wurde, zeigte sich die höchste Quote an Kapillaren mit über 80 %. Die zweithöchste Rate an Kapillaren wurde mit 78,6 % in der Gruppe von Tieren entdeckt, die mit 125 ng bFGF behandelt wurden. In den Angiogeningruppen fand sich die höchste Kapillarquote in der 10 und 100 ng Angiogeningruppe mit 75,3 bzw. 72,4 %. In der Kontrollgruppe betrug die Quote an Kapillaren 75 %.

Kategorie	Kapillaren (%)	Präkapillaren (%)	Arteriolen (%)	Kleine Arterien (%)
Kontrollgruppe	75,0	24,1	0,7	0,2
bFGF (62,5 ng)	67,2	32,0	0,8	0,0
bFGF (125 ng)	78,6	20,3	0,8	0,3
bFGF (250 ng)	80,8	18,6	0,5	0,1
ANG (10 ¹ ng)	75,3	24,4	0,3	0,0
ANG (10 ² ng)	72,4	27,2	0,3	0,1
ANG (10 ³ ng)	69,9	29,8	0,2	0,1
ANG (10 ⁴ ng)	70,5	28,9	0,4	0,2

TABELLE 5:

Prozentuale Verteilung der Gefäße in den einzelnen Gruppen nach Größe (Gefäßquerschnitt), klassifiziert anhand der Richtlinien aus TABELLE 2.

bFGF – basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor,

ANG – Angiogenin

4.4.3 Diskussion

Zur Untersuchung der angiogenetischen Eigenschaften von Angiogenin in vivo wurde ein Tiermodell an Ratten entwickelt, das die quantitative Analyse der angiogenetischen Potenz von Wachstumsfaktoren unter standardisierten Bedingungen in ischämischem Gewebe ermöglicht. Ischämische Bedingungen wurden gewählt, um eine dauerhafte Gefäßneubildung zu induzieren. Angiogenese in vivo induziert durch Applikation von Wachstumsfaktoren führt zur Neubildung von "Luxusgefäßen", einer nur vorübergehenden Gefäßneubildung (Thompson et al., 1989), die durch Reabsorption nach 3–4 Wochen wieder verschwunden ist. Zur dauerhaften, persistierenden Gefäßneubildung ist ein Bedarf, ein Versorgungsgebiet notwendig. Dies unterstreichen die Untersuchungen von Reinecke und Hort, (1992). Der Bedarf für neue persistierende Gefäße wurde durch gezielte Induktion ischämischer Verhältnisse – die Resektion der Arteria femoralis auf 1 cm Länge in den Rattenhinterbeinen – geschaffen. Um die Wirkung der lokal applizierten Wachstumsfaktoren auf die Angiogenese zu untersuchen, wurde das Mitogen auf eine inerte, leicht identifizierbare Leitstruktur aufgetragen. Dazu eignet sich PTFE besonders, da es sehr gut gewebeverträglich ist. Die Erzeugung einer Gewebeischämie führt ihrerseits zur Induktion von Angiogenese (Banchero, 1987; Gewirtz, 1991; Schaper et al., 1988). Um die allgemeine, ischämiebedingte Gefäßinduktion von den Angiogeneseeffekten der lokal applizierten Wachstumsfaktoren diskriminieren zu können, wurde nur die Angiogenese direkt um den implantierten PTFE-Faden, der mit dem Mitogen beschichtet war, quantitativ ausgewertet und mit den Kontrolltieren verglichen, die nach der Erzeugung der Ischämie einen unbeschichteten 1cm langen PTFE-Faden implantiert erhielten.

Das entwickelte Tiermodell an der Ratte erwies sich als gut standardisierbar und gut zu handhaben. Die erzeugte Ischämie zur Induktion einer bedarfsgerechten Stimulation der Angiogenese erwies sich als hinreichend und war in keinem Fall so schwerwiegend, daß es zu Nekrosen und damit irreversiblen Schäden an den Rattenhinterläufen kam, wie dies in Vorversuchen der Fall war. Dort war zur Induktion einer Ischämie der Hinterläufe 1 cm der Arteria iliaca reseziert worden. Die vorhandene Kollateralisation bei der Ratte war nach Resektion der Arteria femoralis auf 1 cm Länge ausreichend, um initial nach Induktion der Ischämie einen Gewebsuntergang zu verhindern. Das Ausmaß präformierter Kollateralen und damit die initiale Kompensationsmöglichkeit akuter Ischämien ist von Tierspezies zu Tierspezies und auch von Organ (Körperregion) zu Organ (Körperregion) verschieden. Das derartige Gefäße und sich überlappende Versorgungsgebiete selbst in Endstromgebieten in unterschiedlich starker Ausprägung existieren, konnte mit einer neuen Untersuchungstechnik in vivo am Kaninchenmyokard nachgewiesen werden (Cicutti et al., 1992). Eine direkte Übertragung der in unserem Tiermodell gefundenen Dosis-Wirkungsbeziehungen angiogenetischer Faktoren zur Stimulation der Angiogenese unter Ischämiebedingungen auf andere Körperregionen oder andere Tierspezies und insbesondere auf den Menschen ist ohne weitere Versuchsreihen aufgrund der spezies- und locoregionalen Unterschiede der Kompensation nicht zulässig. Als prinzipielles Modell zur Untersuchung der Potenz angiogenetischer Faktoren zur Induktion der Angiogenese im Sinne einer indirekten Revaskularisation von ischämischen Geweben ist das vorgestellte Tiermodell jedoch gut geeignet.

Angiogenin und bFGF sind im Kaninchenhornhauttest und im CAM-Assay potente Stimulatoren der Angiogenese. In diesen biologischen Testsystemen zeigte die Stimulation der Angiogenese durch gefäßstimulierende Faktoren eine deutliche Dosisabhängigkeit. Wie die Ergebnisse im vorliegenden standardisierten Rattenmodell zeigten, besteht eine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung der Stimulation der Angiogenese auch *in vivo*. Sowohl für die lokale Applikation von Angiogenin als auch von bFGF nach Erzeugung der Ischämie in den Rattenhinterläufen ließ sich dieser Effekt nachweisen. Bezüglich der angiogenetischen Potenz zeigte Angiogenin bereits bei lokaler Applikation von 10 ng nach 07 Tagen eine signifikante Gefäßstimulation ($P < 0,046$), die bei Applikation von 100 ng hoch signifikant ($P < 0,002$) ausfiel und ein Optimum erreichte. Die lokale Applikation noch höherer Dosen Angiogenin (1000 ng, bzw. 10000 ng) führte zu keiner weiteren Stimulation der Angiogenese. Im Gegenteil die Gefäßneubildung war bei diesen hohen lokalen Dosen von Angiogenin nicht signifikant, sodaß anzunehmen ist, daß es zur Stimulierung der Angiogenese in ischämischen Geweben durch Angiogenin eine optimale lokale Konzentration gibt. Wird diese überschritten, ist die angiogenetische Wirkung nicht mehr vorhanden. Möglicherweise wurde sogar eine gewisse Inhibition der Gefäßneubildung induziert, die spekulativ interpretiert auf einer drastischen, gegenregulatorischen Herunter-Regelung der Rezeptoren aufgrund des massiven Überangebots an Angiogenin beruhen könnte. Eine derartige Gegenregulation wäre sinnvoll, denn sie würde die über den Bedarf hinausgehende und die Synthesemöglichkeiten des Systems übersteigende Gefäßneubildung verhindern. Für die Interaktion von bFGF und seinem Zellrezeptor scheint ein derartiger Regelkreis zu existieren (Neufeld et Gospodarowicz, 1985; Veomett et al., 1989). Es darf aber nicht vergessen werden, daß diese Betrachtungen bisher rein hypothetisch sind, da für Angiogenin bisher ein Rezeptor an Endothelzellen noch nicht nachgewiesen werden konnte. Ob das Angiogenin-bindende Protein an der Zelloberfläche von Endothelzellen, bei dem es sich nachweislich um Aktin handelt, der gesuchte Angiogeninrezeptor ist, kann zur Zeit noch nicht beantwortet werden (Hu et al., 1991; Hu GF et al., 1993).

Betrachtet man die Dosis-Wirkungsbeziehung von bFGF zur Induktion der Angiogenese in diesem Tiermodell, so führte erst die lokale Applikation von 250 ng bFGF zu einer statistisch hoch signifikanten Gefäßneubildung ($P < 0,002$). Die gefäßneubildende Wirkung von Angiogenin erwies sich in diesem standardisierten Tiermodell als 2,5-fach stärker als die von bFGF. Ob ein derartiger Vergleich sinnvoll ist, muß angefochten werden, da nach bisherigen Erkenntnissen die molekularbiologische Reaktionskette für Angiogenin und bFGF wahrscheinlich höchst verschieden ist und lediglich das Endprodukt, die Stimulierung der Gefäßneubildung, identisch ist. Betrachtet man den prozentualen Anteil an Kapillaren in den jeweiligen Gruppen 07 Tage nach Ischämieerzeugung und Mitogenapplikation, so lag der höchste Anteil an Kapillaren mit bis zu 80 % in der Gruppe, die 250 ng bFGF erhielt. In den Angiogeningruppen betrug der höchste Kapillaranteil 75 % und wurde nach Applikation von 10 ng Angiogenin beobachtet. Bei höheren Dosen Angiogenin ging der Kapillaranteil auf 70 % zurück, wie die Auswertung für die Gruppen ergab, die mit 1000 ng bzw. 10000 ng Angiogenin behandelt worden waren. Interessant ist der Vergleich mit der Kontrollgruppe. Hier betrug der Anteil an Kapillaren an der jeweiligen Gesamtgefäßzahl 75 %. Auf den ersten Blick erscheint es, als sei die angiogenetische Wirkung von bFGF überwiegend auf die Stimulation der Kapillarneubildung gerichtet. Angiogenin hingegen scheint sowohl die Kapillarneubildung, als auch die Bildung von Präkapillaren aus Kapillaren zu stimulieren. Das Verhältnis von Kapil-

laren zur Gesamtgefäßzahl lag unter Stimulation der Angiogenese mit Angiogenin bei 72–75 % und ist dem in den Kontrollgruppen identisch, sodaß man vermuten kann, daß Angiogenin eine Stimulation der Angiogenese bewirkt, die dem physiologischen endogenen Stimulationsmuster der Angiogenese, z. B. durch Erzeugung einer Ischämie nahek kommt, während bFGF bevorzugt die Neubildung von Kapillaren stimuliert. Da Präkapillaren durch Proliferation aus Kapillaren entstehen, kann es jedoch auch sein, daß der Neubildungsprozeß von Gefäßen unter Stimulation mit Angiogenin schneller abläuft als unter bFGF und dadurch 07 Tage nach Induktion der Angiogenese durch Angiogenin bereits ein größerer Anteil der neugebildeten Kapillaren schon zu Präkapillaren weiterproliferiert ist, als in den bFGF-stimulierten Gruppen. Geht man jedoch davon aus, daß die Induktion der Angiogenese ein komplexer Vorgang ist, bei dem viele zum Teil noch unbekannte Faktoren mit hineinwirken und interagieren, so ist diese einfache Interpretation anhand der vorliegenden Daten nicht belegbar. Auf jeden Fall ist zu bedenken, daß in diesem Tiermodell bei der Induktion der Angiogenese zwei möglicherweise miteinander interagierende Mechanismen eine zentrale Rolle spielen:

1. Die Erzeugung einer Ischämie in den Rattenhinterbeinen führt zu einer endogenen kompensatorischen Stimulation aller Mechanismen, die die erzeugte Ischämie überwinden hilft, wie Eröffnung und Weitstellung von präformierten Kollateralen. Mit hoher Wahrscheinlichkeit tritt auch eine Stimulation der Angiogenese durch Freisetzung von angiogenetischen Faktoren aus der extrazellulären Matrix auf.
2. Die lokal auf PTFE-Fäden eingebrachten Wachstumsfaktoren Angiogenin und bFGF bewirken ebenfalls eine Neubildung von Gefäßen, wobei der stimulatorische Effekt dieser Faktoren sicher lokal, also direkt um den implantierten PTFE-Faden am größten ist.

Da in diesem Tiermodell nach Erzeugung der Ischämie in den Rattenhinterläufen die Angiogenese nur um den mit angiogenetischen Faktoren beschichteten PTFE-Faden untersucht wurde, ist davon auszugehen, daß die beobachteten angiogenetischen Wirkungen fast ausschließlich eine Folge der lokal eingebrachten Wachstumsfaktoren sind. Bei dem Auftreten von Gewebsischämien scheint die endogene Freisetzung von bFGF bei der Induktion der Angiogenese eine Rolle zu spielen, wie Untersuchungen an Skelettmuskeln bei Kaninchen nach exzessiver elektrischer Stimulation und intensivem Muskeltraining ergaben (Morrow et al., 1990). Traumatische Schäden mit nachfolgender Ischämie führen zumindest im Nervengewebe ebenfalls zur Freisetzung von bFGF (Follesa et al., 1994). Erste erfolgreiche therapeutische Einsätze von bFGF beim Menschen zur Stimulation der indirekten Revaskularisierung von gestielten Lappen werden aus der plastischen, rekonstruktiven Chirurgie berichtet. Eine Stimulation der Randzonengefäßneubildung gestielter Lappen konnte durch subkutane Injektion von bFGF therapeutisch beim Menschen genutzt werden (Uhl et al., 1994).

Betrachtet man diese Ergebnisse mit den Effekten, die die lokale Applikation von Angiogenin in steigender Dosierung bewirken, so läßt sich auch eine eindeutige Dosis-Wirkungs-Beziehung feststellen (ABB. 23). Für Angiogenin scheint die optimale lokale Dosis in die-

sem Tiermodell zwischen 10 ng (Wilcoxon Rank Sum Test, $P < 0,046$) und 100 ng (Wilcoxon Rank Sum Test, $P < 0,002$) lokal applizierten Angiogenins zu liegen. Für bFGF wurde in diesem Modell eine maximale Stimulation der Gefäßneubildung bei 250 ng lokal applizierten bFGF (Wilcoxon Rank Sum Test, $P < 0,002$) beobachtet. Der initiale angiogene Effekt 07 Tage nach Ischämieinduktion und lokaler Applikation der Mitogene beruht auf der Neubildung hauptsächlich von Kapillaren (ABB. 24).

Bei dem Vergleich der Ergebnisse der Experimente aus dem Abschnitt 4.3.2 (Langzeitwirkung lokal applizierten Angiogenins) mit den Ergebnissen aus dem Abschnitt 4.4.2 (dosisabhängige Wirkung von Angiogenin und bFGF) fällt auf, daß die Gefäßdichte im Versuch 4.4 mit 350 Gefäßen/mm² in der Kontrollgruppe deutlich höher ist, als in der Kontrollgruppe im Versuch 4.3 mit nur ca. 80 Gefäßen/mm² 07 Tage nach Ischämie, obwohl es sich in beiden Versuchskollektiven um männliche Ratten aus dem gleichen Inzuchtstamm handelte. Eine mögliche Erklärung ist, daß

1. zwischen den beiden Versuchsreihen ein Zeitintervall von ca. einem halben Jahr lag, sodaß es sich zwar um männliche Lewis Inzuchtratten des gleichen Stammes, aber nicht der gleichen Generation und der gleichen Population handelte und
- 2., daß die Tiere im Versuch 4.3 bereits 10 Wochen alt waren, im Vergleich zu den Tieren in Versuch 4.4, die erst 6 Wochen alt waren. Im Versuch 4.3 handelte es sich um ausgewachsene Ratten, während in Versuch 4.4 die Ratten noch in der jugendlichen Wachstumsphase waren. Möglicherweise ist unter physiologischen Bedingungen der Gefäßbaum bereits im frühen Erwachsenenalter komplett angelegt und im weiteren Wachstum kommt es durch Hypertrophie der Strukturen im wesentlichen nur zur Verschiebung zu größeren Gefäßquerschnitten mit Verringerung der Anzahl der Gefäße/mm², wie dies für die Koronaräste nachgewiesen werden konnte (Reinecke und Hort, 1992). Die Fähigkeit zur Kapillarneubildung scheint jedenfalls zumindest im menschlichen Herzen mit zunehmendem Alter deutlich abzunehmen (Rakusan et al., 1992).

Unstrittig bleibt, daß dieses Tiermodell eine quantitative Untersuchung der indirekten Revascularisation (Neo-Angiogenese) in vivo unter Ischämiebedingungen und dem Einfluß von Wachstumsfaktoren erlaubt.

Ähnliche Ergebnisse werden in einem vergleichbaren Ischämiemodell bei Kaninchen von Baffour et al., (1992) nach mehrfacher intramuskulärer Injektion von 1–3 µg bFGF und von Takeshita et al., (1994) nach einmaliger intraarterieller Applikation von 500–1000 µg vaskularem Endothelwachstumsfaktor (VEGF) berichtet. 40 Tage nach Erzeugung der Ischämie durch Resektion der Arteria femoralis und einmaliger intraarterieller Bolusgabe von VEGF 10 Tage nach Ischämieinduktion konnte eine statistisch signifikant höhere Kapillardichte von 230/mm² im Vergleich zu den Kontrolltieren mit 83 Kapillaren pro mm² festgestellt werden. Sowohl die tägliche intramuskuläre Injektion von 1 µg als auch von 3 µg bFGF über 14 Tage nach Ischämieinduktion führte zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl an Kapillaren pro mm² in der ischämischen Muskulatur der Kaninchen. Mit 311 Kapillaren pro mm² nach Gabe von täglich 3 µg bFGF und 214 Kapillaren pro mm² nach Gabe von täglich 1 µg bFGF (Kontrolltiere 149 Kapillaren pro mm²) zeigte sich in diesem Tiermodell ebenfalls eindeutig eine Dosis-Wirkungsrelation für die angiogenetische Wirkung des applizierten Wachstumsfaktors bFGF (Baffour et al., 1992).

4.5 Zusammenfassung

In einem standardisierten Tiermodell an der Ratte konnte der Effekt lokal applizierter angiogenetischer Faktoren quantitativ als indirekte Revaskularisierung im ischämischen Gewebe untersucht werden. 07 Tage nach chirurgisch erzeugter Ischämie in den Rattenhinterläufen stimulierte basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor, lokal in einer Dosis von 250 ng appliziert, die Angiogenese hoch signifikant ($P < 0,002$) im Vergleich zu den Kontrolltieren. Angiogenin war bereits in lokalen Dosen von 10 ng statistisch signifikant angiogenetisch wirksam ($P < 0,046$). 100 ng Angiogenin induzierten die Gefäßneubildung in diesem Modell sogar auf einem hoch signifikanten Niveau ($P < 0,002$) im Vergleich zu den Kontrolltieren. Selbst die geringe lokale Dosis von nur 1,9 ng appliziertem Angiogenin war in der Lage, 07 Tage post OP die Kapillarneubildung im Vergleich zu den Kontrollen und zu den Collagen I Gruppen signifikant zu stimulieren ($p \leq 0,05$). Im zeitlichen Ablauf 07–70 Tage nach Induktion der Ischämie läßt sich die Regulation der Angiogenese als eine gedämpfte Sinusschwingung um den Regelwert (Sollwert) darstellen. Eine Steigerung der Angiogenese durch Wachstumsfaktoren resultiert sowohl in einer größeren initialen, dann langsam abnehmenden Amplitude, als auch einer höheren Anfangsfrequenz der Schwingung, die dann langsam wieder abnimmt.

5. SEKTION II:

Tiermodell zur Testung der Offenheitsrate von kleinlumigen ($\varnothing 2\text{mm}$) Gefäß-Prothesen mit angiogenetischer Beschichtung

5.1 Vorbemerkungen

Angiogenetische Proteine sind potente Mitogene, die in vivo und in vitro Gefäßneubildungen induzieren (Folkman et Klagsbrun, 1987; Thomas et Gimenez-Gallego, 1986). In Zellkulturen werden Adhäsion, Zellmigration und -replikation von Endothelzellen durch angiogenetische Faktoren um ein Vielfaches stimuliert (Bashkin et al., 1989; Burgess et Maciag, 1989), besonders wenn die Oberfläche der Zellkulturschalen mit einem Matrixfaktor, wie z. B. Collagen, Gelatine oder Fibronektin beschichtet wurde (Delvos et al., 1982; Fasol et al., 1985; Montesano et al., 1983). Insbesondere die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix ist für die phänotypischen Eigenschaften der Endothelzellen verantwortlich (Ignotz et Massagué, 1986). Basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) ist ein potentes angiogenetisches Protein aus der Klasse der heparin-bindenden Endothelzellen-Wachstumsfaktoren (Burgess et Maciag, 1989; Folkman et Klagsbrun, 1987; Gospodarowicz et al., 1986; Thomas et Gimenez-Gallego 1986). In Zellkulturen stabilisiert bFGF den für Endothelzellen typischen Phänotyp (Pflastersteinmuster) auch nach vielfacher Passage und Subkultivierung (Gospodarowicz et al., 1986; Méresse et al., 1989). Menschliches bFGF ist eine dreifache Wiederholung eines viersträngigen antiparallelen β -Meanders. Das Polypeptid besteht aus 154 Aminosäuren bei einem Molekulargewicht von ca. 18000 Da und N-terminaler Blockierung. Die räumliche Konfiguration von bFGF ist dabei dem Interleukin 1 β gleich bei nur 10 % Sequenzhomologie (Zhang et al., 1991). Angiogenin ist ein weiterer potenter Stimulator der Angiogenese, unterscheidet sich aber von der Gruppe der heparin-bindenden Endothelzell-Wachstumsfaktoren. Es ist ein einsträngiges Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 14400 Da bestehend aus 123 Aminosäuren und einer zu 35 % mit den Pankreasribonukleasen identischen Aminosäuresequenz (Vallee et Riordan, 1988). Ein Modell der dreidimensionalen Struktur von Angiogenin findet sich bei Palmer et al., (1986). Angiogenin als Mitogen zur in vivo Endothelialisierung von Gefäßprothesen zu testen, war aus mehreren Gründen interessant:

1. Angiogenin ist ein hochpotenter Stimulator der Gefäßneubildung, der lokal appliziert bereits im Nanogramm-Bereich wirksam ist (Abschnitt 4.3.3 und 4.4.3).
2. Angiogenin erhöht die Adhäsion von Endothelzellen auch an Plastikoberflächen sogar unabhängig von Matrixfaktoren (Soncin, 1992).
3. Angiogenin ist leicht zu handhaben, weil es in wässriger Lösung bei 4 °C wochenlang stabil lagerbar ist und auch gegen proteolytische, enzymatische Degradation weitgehend resistent ist (Harper et Vallee, 1988).
4. Humanes Angiogenin steht rein zur Verfügung. Es kann gentechnisch aus rekombinanten Baby Hamster Nierenzellen isoliert werden (Kurachi et al., 1988; Fox et Riordan, 1990), oder in rekombinanten Escherichia coli Zellen exprimiert werden (Shapiro et al., 1988; Fox et Riordan, 1990).

Beide Proteine wurden in fast allen normalen Geweben gefunden. Angiogenin konnte aus normalem menschlichem Plasma (Shapiro et al., 1987) und aus Milch (Rind) isoliert werden (Maes et al., 1988), aber auch aus verschiedenen Tumorzelllinien (Fett et al., 1985; Shapiro et al., 1987). Wachstumsfaktoren wirken gefäßneubildend in einem Dosisbereich von Nanogramm in vivo und in vitro. Ihre Bedeutung scheint generell und nicht speziesspezifisch zu sein, wie die weite Verbreitung und die große Molekülübereinstimmung aller bisher analysierter Angiogene verschiedenster Spezies belegt (Bond et Strydom 1989; Bond et Vallee, 1990; Bond et al., 1993; Strydom et al., 1985). Das augenblickliche Interesse in der Gefäßchirurgie ist auf die Entwicklung erfolgreicher Gefäßbypass-Materialien mit einem Innendurchmesser von 2–6mm gerichtet. Die Offenheitsrate kleinkalibriger Gefäßprothesen (Innendurchmesser < 6mm) ist immer noch nicht zufriedenstellend, trotz der großen Anstrengungen die unternommen wurden, die Bypassmaterialien und das begleitende Antikoagulationsschema zu verbessern. Erfolgversprechende Ergebnisse zur Verbesserung der Offenheitsrate kleinkalibriger Gefäßprothesen zeigten Versuche mit Endothelzellen zur Beschichtung der Bypassoberfläche (Graham et al., 1982; Kent et al., 1988; Kent et al., 1989; Shindo et al., 1987). Ein Haupthindernis einer weiten klinischen Anwendung dieser Methode stellt der große Personal- und Zeitaufwand im OP dar. Ein weiteres noch nicht ausreichend gelöstes Problem dieser Methode ist die begrenzte Widerstandsfähigkeit der Endothelzellschicht gegenüber Scherkräften (Miyata et al., 1991). Unser Interesse galt der Untersuchung von bFGF und Angiogenin als Beschichtungssubstanzen kleinkalibriger Gefäßprothesen, insbesondere deren Einfluß auf die Offenheitsrate. Ein besonderes Augenmerk galt einer möglichen Rolle dieser Substanzen im Falle einer in vivo Endothelialisierung der Prothese. Zur Behandlung dieser Fragestellung mußten ein geeignetes Tiermodell entwickelt und die Prothesenimplantationstechnik sowie die Nachuntersuchungskriterien standardisiert werden. Den ersten Schritt stellte jedoch die Entwicklung einer Methode zur Beschichtung der Prothesen dar, bei der die biologische Aktivität der Angiogenesefaktoren unbeeinträchtigt erhalten bleibt.

5.2 Tiermodell

White New Zealand Kaninchen reagieren auf Ischämien im infrarenalen Bereich aufgrund großer Gefäßverbindungen zum Spinalkanal sehr sensibel mit neurologischen Ausfällen bis zu Lähmungen der Hinterläufe. Je nach Alter und Größe der Tiere hat die abdominelle Aorta ein Kaliber von 2–4 mm. Aus beiden vorgenannten Gründen wurden White New Zealand Kaninchen zur in vivo Testung der Offenheitsrate von Gefäßprothesen mit einem Durchmesser von 2 mm als geeignetes Tiermodell angesehen. Um ein aussagefähiges Modell zur Testung der "patency rate" kleinkalibriger Gefäßprothesen in vivo zu installieren, sollte die Länge der implantierten kleinkalibrigen Gefäßprothese mindestens 10-mal größer sein als ihr Durchmesser, d.h. für Prothesen mit einem Durchmesser von 2 mm sollte die Länge der implantierten Prothese mindestens 20 mm = 2 cm betragen. Der Ersatz der abdominellen Aorta bei White New Zealand Kaninchen ist zur Implantation 2–5 cm langer Gefäßprothesen gut geeignet. Aufgrund der hohen Ischämieempfindlichkeit des Rückenmarks der Tiere wurden 5 cm lange PTFE-Prothesen mit einem Durchmesser von 2 mm in fortlaufender Anastomosennahttechnik mit 7x0 Prolene end-zu-seit implantiert, jeweils unter kurzzeitiger und kurzstreckiger tangentialer Ausklemmung der abdominellen Aorta. Zur Erhöhung der Ischämieto-

leranz des Rückenmarks wurde vor dem Ausklemmen ein Barbiturat iv gegeben. Nach der Freigabe der Blutzirkulation durch die Prothese wurde die Aorta proximal der distalen Anastomose ligiert (ABB. 26).

5.3 Methodik

5.3.1 Prothesenbeschichtung mit angiogenetischen Faktoren

Präparation der Prothesen:

Sterile expanded Polytetrafluoräthylen (ePTFE) Prothesen, Innendurchmesser 2 mm (Geschenk der Impra Corp.) wurden in 5cm lange Prothesenstücke geschnitten (ABB. 25). Jeweils ein Prothesenende wurde mit einem Ligaclip^R (Ethicon) verschlossen. Jedes Prothesenstück wurde 3x mit 100 % Äthylalkohol (Aaper Alcohol & Chem. Co.) durchgespült, um die Prothese hydrophiler zu machen (Trudell et al., 1978). Nach 3x-iger Spülung mit 0,9 %-iger Kochsalzlösung (Baxter Corp.) wurde jede Prothese 3x mit autoklavierter steriler, wässriger 0,1 %-iger Gelatinelösung, gewonnen aus Rinderhaut (Sigma Chem.), durchgespült. Anschließend wurde das Lumen jeder Prothese mit der Gelatinelösung aufgefüllt. Das offene Ende jedes Prothesenstückes wurde mit einem zweiten Ligaclip^R verschlossen und eine Lyophilisierung über 24 h angeschlossen.

Beschichtung mit Angiogenesefaktoren:

Nach Wiedereröffnung eines Endes der mit Gelatine beschichteten Prothesenstücke wurde das Lumen der 5 cm langen Prothesen mit 150 µl eiskalter Lösung (+4 °C) von

- a) 285 µg Angiogenin in H₂O [humanes Angiogenin rekombinant aus E. coli in H₂O (3,8 mg/ml) von Hoechst, aufbewahrt bei +4 °C].
- b) 1µg basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) in Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) + 40 ng Rinderserumalbumin (RSA) als Trägersubstanz [lyophilisierter humaner bFGF rekombinant aus E. coli von R&D, aufbewahrt bei -70 °C in PBS und 0,2 % RSA von Sigma)
- c) a) + b)
- d) 100E Heparin (1000E/ml) Elkins-Sinn Corp.
gefüllt. Das offene Prothesenende wurde mit einem Ligaclip^R verschlossen und sofort schockgefroren bei -70 °C. Anschließend wurden die Prothesen über Nacht lyophilisiert. Alle Verfahren wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

5.3.2 Tierversuch

Versuchstiere:

10 männliche White New Zealand Kaninchen (3–5 kg Körpergewicht) wurden von PINE bezogen. Alle Tiere wurden bei einem täglichen Zyklus von wechselnd 12 h langen Perioden von Helligkeit und Dunkelheit gehalten. Die Kaninchen erhielten Nahrung und Wasser ad libitum. Sie wurden mindestens eine Woche an ihre neue Umgebung akklimatisiert, bevor mit den Experimenten begonnen wurde. Alle Experimente wurden durchgeführt unter Einhaltung der Richtlinien für Tierexperimente des National Institutes of Health. Die Gruppeneinteilung der Tiere erfolgte zufällig. Alle Operationen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Anästhesie:

Zur Narkose wurden intramuskulär 50 mg/kg Körpergewicht (KG) Ketamin-HCl (Ketaset^R von Aveco Co., Inc.) und 1,0 mg/kg KG Promazinmaleat (TechAmerica) und 0,05 mg/kg KG Atropinsulfat (Webster Inc.) gegeben. Falls erforderlich wurde die Narkose mit weiteren 10 mg/kg KG Ketamin und 0,5 mg/kg KG Promazin intravenös verlängert. Zusätzlich erhielten alle Tiere 5 min. vor dem Ausklemmen der abdominalen Aorta 1,0 mg/kg KG Pentobarbital-Na (Nembutal^R von Abbott Lab.) intravenös zur Protektion des Rückenmarks vor einem ischämischen Schaden während der Aortenabklemmzeit. Zur Flüssigkeitsbilanzierung wurden während der Operation 1–2 ml Ringerlaktat (Baxter Healthcare Corp.) pro Minute intravenös über eine laterale Ohrvene gegeben.

Operationsvorbereitung:

In Narkose wurden beide Leistenregionen und das Abdomen der Tiere mit einem elektrischen Schermesser enthaart. Anschließend wurden die Tiere in Rückenlage auf dem OP-Tisch gelagert und alle 4 Läufe mit gepolsterten Bandagen fixiert. Die Hautdesinfektion erfolgte durch dreimaliges Abwaschen mit einem jodhaltigen Desinfektionsmittel.

Antibiotikaphylaxe:

Vor OP-Beginn erhielt jedes Tier intraperitoneal 8 mg/kg KG Ampicillin (Polyflex^R, Bristol Lab.). Weitere 4 mg/kg KG Ampicillin wurden vor dem Verschluss der Bauchdecken intraperitoneal gegeben.

Antikoagulation:

400 E/kg KG Heparin (Elkins-Sinn Inc.) wurden einmalig intravenös 5 min. vor dem Abklemmen der Aorta gegeben. Eine zweite Dosis von 200 E Heparin intraperitoneal wurde vor

dem Verschluß des Abdomens appliziert. Weitere Maßnahmen zur Antikoagulation wurden nicht getroffen.

Operation:

Das Abdomen wurde über eine mediane Längslaparotomie eröffnet und ohne Auslagerung der Darmschlingen erfolgte die Präparation der abdominalen Aorta. Vor der Implantation der Gefäßprothese wurde diese kräftig mit Luft aus einer 5 ml Spritze durchgeblasen, um intraluminal verbliebene Reste der Beschichtungsprozedur zu entfernen. Zuerst wurde die proximale Anastomose end-zu-seit mit einer fortlaufenden 7-0 Prolene^R Naht hergestellt unter passagerem segmentalen Ausklemmen der Aorta. Auf die gleiche Art wurde die distale Anastomose angelegt. Kurz vor Fertigstellung der distalen Anastomose wurde die Prothese einmal kräftig mit Blut durchgespült und der Fluß durch die Prothese überprüft. Nach der Freigabe der Blutzirkulation durch die Prothese wurde die Aorta proximal der distalen Anastomose ligiert (ABB. 26). Nach dem Verschluß der Bauchdecken mit einer fortlaufenden, atraumatischen 4-0 Prolene^R Naht (Ethicon) erwachte das Tier aus der Narkose.

5.3.3 Auswertung

Nachschau:

Nach Beenden der Operation wurden alle Tiere in 30-minütigen Abständen untersucht. Die Durchgängigkeit der Prothese wurde klinisch (Pulsstatus, spontane und provozierte Motorik der Hinterläufe) und doppler-sonographisch überprüft.

Dokumentation:

Bei Auftreten neurologischer Ausfälle und sonographischem Verdacht des Prothesenverschlusses oder beim Auftreten einer Paraplegie wurden die Kaninchen sofort narkotisiert und das Abdomen wiedereröffnet. Bestätigte sich der Verdacht eines Prothesenverschlusses in situ wurde nach fotografischer Dokumentation das Tier mit einer Überdosis an Narkotika getötet. En bloc wurden die abdominale Aorta und die implantierte PTFE-Prothese explantiert. Jedes entfernte Präparat wurde auf technische Perfektion der Anastomosennähte und auf die Art, Größe und Lokalisation des aufgetretenen Thrombus untersucht und fotografisch dokumentiert. Die innere Prothesenoberfläche wurde auf Endothelzellen untersucht:

- a) mit Anti-Faktor VIII immunfluoreszierenden Antikörpern unter einem epifluoreszierenden Mikroskop nach Fixierung mit 3,5 %-igem Formaldehyd in PBS gemäß der Anleitung [monoklonale Faktor VIII Antikörper von der Maus und negatives Kontrolserum der Maus von BioGenex Lab. Fluoreszein-konjugiertes, affinitätsgereinigtes F(ab')² Fragment Anti-Maus IgG von der Ziege (spezifische schwere & leichte Ketten) von Cappel Organon Teknika Corp.].

- b) durch Lichtmikroskopie der Formalin fixierten Präparate nach Färbung mit Hämatoxylin/Eosin bei einer 100-fachen Vergrößerung.

5.4 Ergebnisse

Erstmals wird über ein standardisiertes Tiermodell zur Testung der Offenheitsrate von 2 mm im Durchmesser messenden Gefäßprothesen berichtet. Das Auftreten einer Paraplegie bei den Tieren war ein sicheres und untrügliches Zeichen für das Vorliegen eines Prothesenverschlusses und bestätigte die doppler-sonografischen Untersuchungsbefunde. Die Ergebnisse der getesteten Prothesen sind in der TABELLE 6 aufgelistet. Insgesamt war die Offenheitsrate von weniger als 24 h aller Gefäßprothesen für die klinische Anwendung nicht akzeptabel. Offensichtlich ist, daß die Beschichtung der Prothesen mit bFGF und Angiogenin bezüglich der Prothesenoffenheitsrate besser als alle anderen Beschichtungen ist, wie die TABELLE 6 zeigt. Die Prothesen, die mit bFGF und Angiogenin beschichtet waren, zeigten nach 24 h lediglich einen kleinen Thrombus im Bereich der distalen Anastomose (ABB. 27), wohingegen alle anderen Prothesen bereits 1–8 h nach der Implantation eine komplette Thrombosierung der gesamten Prothese aufwiesen (ABB. 28, 29). Mikroskopische Untersuchungen aller Thromben zeigten ein einheitliches Bild eines frischen thrombozytenreichen Gerinnsels. Anti-Factor VIII immunchemische Untersuchungen der Prothesenoberflächen ergaben bei keiner Prothese einen Anhalt für die Migration oder die Anheftung von Endothelzellen an die innere Prothesenoberfläche.

Implantierte Prothese	Anzahl	Mittlere Abklemmzeit (min)	Funktionsfähigkeit (hrs)	Prothese thrombosiert
Kontrolle (Gelatin beschichtet)	02	9,5 (+/- 0,5)	1 (+/- 0,2)	komplett
Angiogenin beschichtet	02	9,0 (+/- 1,0)	8 (+/- 0,5)	komplett
bFGF beschichtet	02	8,5 (+/- 1,5)	6 (+/- 0,5)	komplett
ANG + bFGF beschichtet	02	9,0 (+/- 0,5)	23 (+/- 1,0)	nur distale Anastomose
Heparin beschichtet	02	8,5 (+/- 1,0)	2 (+/- 0,5)	komplett

TABELLE 6:

Offenheitsrate der implantierten PTFE-Prothesen (Ø 2mm, Länge 5cm) in Aortenposition in White New Zealand Kaninchen und das Ergebnis der pathologischen Evaluation. Zusätzlich ist die mittlere Aortenabklemmzeit bei der Implantation der Prothesen aufgelistet.

5.5 Diskussion

Die nicht zufriedenstellende Offenheitsrate aller Prothesen unabhängig von ihrer Beschichtung ist teilweise auf die Beschichtung mit Gelatine als Matrixfaktor zurückzuführen. Matrixfaktoren, wie z. B. Gelatine, Collagen sind sehr thrombogen, wenn sie mit Blutplättchen und Gerinnungsfaktoren interferieren (Johnson, 1990). Andererseits erhöht die Applikation eines Matrixfaktors erheblich die Bindungsfähigkeit für die applizierten Angiogenesefaktoren und

steigert außerdem die gerichtete Migration von Endothelzellen und deren Oberflächenhaftung (Bashkin et al., 1989; Delvos et al., 1982; Fasol et al., 1985; Shindo et al., 1987).

Weitere Untersuchungen müssen beweisen, ob die zusätzliche Gabe von Antikoagulantien und/oder Thrombozytenaggregationshemmern einen frühzeitigen Prothesenverschluß verhindern können. Erfolgversprechend scheint kovalent an die Prothesenoberflächen gebundenes Heparin zu sein (Lei et al., 1985). Kovalent gebundenes Heparin wird durch den Blutstrom nicht ausgewaschen. Angiogenin und wesentlich stärker bFGF zeigen eine starke Affinität an Heparin zu binden. Ein anderer Ansatz zur Verbesserung der Offenheitsrate kleinkalibriger Gefäßprothesen könnte die Beschichtung der Prothesen mit Antikörpern, gerichtet gegen Glykoproteine der Thrombozytenmembran, sein (Johnson et al., 1991). Grundlagenforschung zur Verbesserung der Blutkompatibilität von Biomaterialien zeigte eindeutig, daß die Adhärenz von Endothelzellen an mäßig benetzbaren, hydrophilen Oberflächen am größten war. Die Oberflächenladung der Biomaterialien hingegen zeigte keine direkte Korrelation zur Endothelzellenadhärenz. Die Vorbeschichtung mit Fibrinogen oder Fibronectin verstärkte die Widerstandsfähigkeit von adhärennten Endothelzellen gegen Scherkräfte erheblich (Engbers et Feijen, 1991).

Die Offenheitsrate kleinkalibriger Gefäßprothesen wird durch viele verschiedene Faktoren beeinflusst und nur die Kombination aller positiv wirkenden Faktoren, wie optimale Oberfläche der Biomaterialien, eine optimale Antikoagulation bzw. Plättchenaggregationshemmung werden eine zufriedenstellende Lösung erlauben. Angiogenesefaktoren können eine bedeutende Rolle für die Langzeitprognose kleinkalibriger Gefäßprothesen spielen aufgrund ihrer Fähigkeit der direkten Stimulation der Migration, Replikation und Oberflächenadhärenz von Endothelzellen (Lindner et al., 1990; McNeil, 1991). Angiogenin kann aufgrund seiner Eigenschaft, die Adhäsion und die Proliferation von Endothelzellen zu stimulieren, eine wichtige Rolle in der Endothelialisierung von Fremdoberflächen spielen.

Collagen oder Gelatine (Gelatine = denaturiertes Collagen) als Matrixsubstanz sind sicher bei der angiogenetischen Beschichtung von Gefäßprothesen zur in vivo und in situ Endothelialisierung aufgrund ihrer großen Thrombogenität, wenn sie ungeschützt mit Blut in Kontakt kommen, nicht zukunftssträchtig. Generell ist zur lokalen Applikation von Angiogenin Collagen als Matrixsubstanz speziell auf PTFE-Oberflächen keine gute Alternative wegen der geringen Bindung von Angiogenin an Collagen-beschichtete PTFE-Oberflächen, wie die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen im Abschnitt 4.3.2 zur Bindung von Angiogenin an PTFE belegen. Der Einfluß von Matrixfaktoren auf die Anheftungs- und Proliferationsfähigkeit von Endothelzellen wurde von Roberts und Forrester, (1990) untersucht. Collagen Typ IV findet sich überwiegend in der Basalmembran und ist wahrscheinlich die natürliche Matrixsubstanz zur Anheftung von Endothelzellen in vivo. Als Ersatzmatrixsubstanzen sind Fibrin, Fibronectin und Laminin geeignet. Collagen I, das im vorliegenden Modell als Matrixsubstanz zur Beschichtung der Prothesen eingesetzt wurde, war nicht in der Lage die Endothelzellenproliferation und -migration in vitro zu unterstützen. Zur lokalen Applikation von Angiogenin scheint Aktin als Matrix- und Trägersubstanz besser geeignet zu sein (Hu et al., 1991; Hu et al., 1993).

In welcher Form und Dosierung die Kombination von bFGF und/oder Heparin mit Angiogenin vorteilhaft bei der Beschichtung von Gefäßprothesen sein könnte, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht absehbar. Zur Verbesserung und Beschleunigung des Beschichtens ("endothelial lining") von Gefäßprothesen in vitro hat bFGF bereits Eingang in die Klinik gefunden. Mit Fibrinkleber und bFGF beschichtete PTFE-Prothesen (\varnothing 6 mm) wurden in vitro mit autologen Endothelzellen beschichtet, die aus einem Stück Patientenvene (Vena saphena oder cephalica) enzymatisch gewonnen und subkultiviert wurden (Zilla et al., 1994). Anschließend wurden die in vitro autolog endothelialisierten PTFE-Prothesen als femoro-poplitealer Bypass zur Umgehung arterieller Verschlüsse in der Oberschenkeletage implantiert. Im Vergleich zu den nicht endothelialisierten Prothesen war die Offenheitsrate bis zu einem Nachbeobachtungszeitraum von drei Jahren wesentlich besser – "seeded" versus "non-seeded": 90 % Offenheitsrate versus 55 % (Zilla et al., 1994). Über Vorteile endothelbeschichteter kardiovaskulärer Implantate wird auch von Fasol et al. (1989); Kaehler et al. (1989); Zilla et al. (1989); Zilla et al. (1991) und Fischlein et al. (1994) berichtet.

Interessant wird sicher auch der Einsatz von Gefäßpermeabilitätsfaktor VPF zur Prothesenbeschichtung sein, der selektiv nur auf Endothelzellen eine proliferative Wirkung ausübt (Ferrara, 1993). Im Gegensatz dazu bFGF, der die Proliferation auch von Fibroblasten und glatten Muskelzellen stimuliert (Callow et al., 1994). Die Kombination von VPF und bFGF scheint bei der Proliferation von Endothelzellen sogar synergistisch zu wirken (Goto et al., 1993; Pepper et al., 1992).

Die Optimierung der Matrixsubstanzen zur Beschichtung von PTFE-Prothesen mit Endothelzellen läßt ebenfalls noch erhebliche Fortschritte erwarten (Schneider et al., 1992). Als synthetisch hergestellte Matrixsubstanz scheint die Kombination von Fibrinogen, Fibronectin und Elastin vielversprechend für die therapeutische Endothelialisierung von Oberflächen zu sein (Lefebvre et al., 1989).

Adjuvante Therapieansätze zur Reduzierung der agglutinierenden Fähigkeiten der Thrombozyten durch die Applikation monoklonaler Antikörper gegen Membran-Glykoproteine der Thrombozyten stellen einen weiteren interessanten Therapieansatz zur Verbesserung der "patency rate" kleinkalibriger Gefäßprothesen dar (Johnson et al., 1991). Vorbedingung für einen erfolgreichen Einsatz kleinkalibriger Gefäßprothesen bleibt jedoch eine exzellente chirurgische Anastomosennahttechnik (Fisher et al., 1985).

Bis industriell gefertigte kleinkalibrige Gefäßprothesen – mit guter Offenheitsrate über einen langen Zeitraum – für den klinischen Einsatz zur Verfügung stehen, sind noch viele Probleme zu lösen. In vitro Studien der Angiogenese mit modifizierten menschlichen Endothelzellen (Green et al., 1994) werden sicher neue und interessante Erkenntnisse für den therapeutischen Einsatz endothelialisierter Oberflächen liefern, die nicht nur für die Herstellung von Gefäßprothesen, sondern auch für die dauerhafte Endothel-Besiedelung von Oberflächen, die permanenten Blutkontakt haben, wie z. B. an Klappenprothesen und in Herzassistenzsystemen von immenser Bedeutung sein werden. Die Lösung der Probleme für eine dauerhafte Endothelbeschichtung von Biomaterialien in vitro und später auch in vivo und in situ wird der Verfügbarkeit eines für den klinischen Dauereinsatz geeigneten Kunstherzens neue Impulse geben.

Welche Endothelzellen für welche Funktion am besten geeignet sind, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch vollkommen offen. Gesichert ist lediglich, daß Gefäßendothelzelle nicht gleich Gefäßendothelzelle ist, sondern organspezifische Unterschiede bestehen. Noch ist unklar, ob es sich dabei um primär strukturell und funktionell unterschiedliche Endothelzellen handelt, oder ob ihre Verschiedenheit sich erst sekundär unter dem Einfluß lokaler "Umweltfaktoren" im Sinne eines Anpassungsprozesses entwickelt hat (Lelkes, 1993).

5.6 Zusammenfassung

In Allgemeinnarkose wurde bei 10 White New Zealand Rabbits die infrarenale Aorta durch eine 5 cm lange (ID = 2 mm) Polytetrafluoräthylen (PTFE) Gefäßprothese ersetzt. Die Prothesen wurden zunächst mit einer Matrixsubstanz (0,1 % Gelatine) beschichtet (Kontrollen). Anschließend erfolgte das Aufbringen von a) 285 µg Angiogenin, oder b) 1 µg Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), oder c) =a)+b), oder d) 100 IE Heparin. Von jedem Prothesentyp wurden jeweils 2 implantiert. Bereits 1 h nach der Operation waren die lediglich mit 0,1 % Gelatine beschichteten Prothesen in ganzer Länge thrombosiert. In c) trat ein Prothesenverschluß erst nach 24 h auf, wobei sich lediglich ein kleiner okkludierender Thrombus im Bereich der distalen Anastomose fand. Alle anderen Prothesen waren spätestens 8 h postoperativ vollständig thrombosiert. Nach der Implantation von 10 Gefäßprothesen stellt sich die Beschichtung mit bFGF + Angiogenin allen anderen getesteten Beschichtungen als überlegen dar. Ziel weiterer Forschung muß die Senkung der Frühverschlußrate kleinkalibriger Gefäßprothesen sein. Erst dann werden sich Langzeiteffekte auf die Endothelialisierungsrate von Gefäßprothesen durch angiogenetisch wirksame Faktoren klinisch relevant untersuchen lassen.

6. SEKTION III:

Phosphorylierung von Angiogenin, basischem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) und Histon V S durch Proteinkinase C (PKC) in vitro

6.1 Vorbemerkungen

Studien über die Aktivierung von Phospholipase C (PLC) und Kalzium/Kalmodulin-abhängiger Proteinkinase II (CaM PK II) durch Angiogenin (Bicknell et Vallee, 1988) führten zu der Vermutung, daß die extrem kationischen Eigenschaften von Angiogenin sehr bedeutsam für die Aktivierung dieser Enzyme sein könnten. Aus diesem Grund erscheint es interessant die Eigenschaften eines weniger kationischen Angiogenins auf diese Enzyme zu untersuchen. Eine Möglichkeit weniger kationisches Angiogenin zu erhalten, stellt die Phosphorylierung von Angiogenin dar. Dieser Aspekt ist attraktiv, weil die Phosphorylierung eine physiologische Reaktion ist, die die Aktivität einer Reihe von Enzymen in vivo moduliert. Außerdem ist die Aktivierung der PKC bei der Signalübertragung extra-/intrazellulär von genereller Bedeutung, insbesondere bei der Kontrolle von zellulären Reaktionen und der zellulären Proliferation (Haller, 1991; Kikkawa et Nishizuka, 1986; Krauss et al., 1990; Weinstein, 1990). Obwohl Angiogenin keinen direkten Effekt auf die Migration von Endothelzellen, Gefäßwandmuskelzellen und Fibroblasten in vitro auszuüben scheint, aktivierte Angiogenin, daß rasch an die Zelloberfläche vieler Zellen bindet, in Endothelzellen Phospholipase C (PLC) und Phospholipase A₂ (PLA₂) und in glatten Muskelzellen der Aorta der Ratte PLC. Versuche in vitro mit Plasmamembranen von glatten Muskelzellen der Aorta der Ratte, die mit Angiogenin inkubiert wurden, zeigten eine erhöhte Synthese von Phosphatidylinositol-Biphosphat (PtdInsP₂), das einen starken mitogenen Stimulus darstellt und auch ein starker Aktivator der Enzymaktivität von PKC ist. Dabei war Angiogenin in Konzentrationen wirksam, wie sie auch für seine angiogenetische Aktivität erforderlich ist (Heath et al., 1989). Interessant sind auch Versuche, die ribonukleotytischen und die angiogenetischen Eigenschaften von phosphoryliertem Angiogenin zu untersuchen.

Seit der Entschlüsselung der Aminosäuren-Sequenz von Angiogenin (Strydom et al., 1985; Bond et Vallee, 1990; Bond et al., 1993) ist bekannt, daß Angiogenin eine Region mit übereinstimmender Sequenz für eine Phosphorylierung durch Proteinkinase C besitzt. Kommerziell erhältliche PKC (von Calbiochem) wird aus Rattengehirn nach einer Methode von Kikkawa et al. (1982) isoliert und ist 95 % rein. Die Reaktionsbedingungen zur Phosphorylierung von PKC aus Rattengehirn nach einer Methode von Feige und Baird (1989) weisen einige Eigenschaften für eine effektive Phosphorylierung von Angiogenin auf:

- i) Diese PKC phosphoryliert in Anwesenheit ihrer Stimulatoren Angiogenin.
- ii) Die Phosphorylierung von Angiogenin erreicht ein Maximum bei Konzentrationen von 40–80 µg/ml Angiogenin und 1 µg/ml PKC. Unter diesen Bedingungen werden ungefähr 3 % des Angiogenins phosphoryliert.

- iii) Die elektrophoretische Wanderung von phosphoryliertem Angiogenin ist verzögert, wenn eine niedrige Angiogeninkonzentration verwendet wird, z. B. 5 µg/ml und beschleunigt, wenn eine hohe Angiogeninkonzentration benutzt wird, z. B. 320 µg/ml.
- iv) Angiogenin wird nur in Gegenwart von PKC phosphoryliert.

6.2 Isolierung und Reinigung der PKC

Mit der kommerziellen PKC phosphoryliertes Angiogenin zeigte eine rasche Tendenz zur Degradation möglicherweise infolge von Kontamination der PKC-Charge mit Proteasen. Zur Verbesserung der Phosphorylierungsrate und in Anbetracht der hohen Kosten für die kommerziell erhältliche PKC (\$ 150/2 µg) wurde nach einer Methode von Walton et al. (1987) aus Rattengehirn PKC isoliert (durchgeführt von Toru Takeuchi, Laborbuch #1229, Center for Biochemical, Biophysical Sciences and Medicine, Harvard Medical School, Boston/USA). Nach dieser Methode ließen sich in zwei Tagen aus 13 Rattenhirnen 100 µg reine PKC isolieren. Die isolierte PKC stellte sich in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese als reines Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 80000 Da (phosphorylierte Form) dar (ABB. 30A). In Übereinstimmung mit der Literatur (Kikkawa et al., 1982; Kikkawa et Nishizuka, 1986) zeigte die isolierte PKC eine ausgeprägte Selbstphosphorylierungsrate (ABB. 30B) in Anwesenheit ihrer Stimulatoren (Ca^{2+} , Phospholipid und Diacylglycerin), wobei ca. 2 Mol Phosphat pro Mol PKC inkorporiert wurden.

6.3 Methodik

Eine detaillierte Auflistung und Beschreibung aller Substanzen und Methoden zur Phosphorylierung von Angiogenin, bFGF und Histon V S durch PKC in vitro und zur Isolierung und Charakterisierung der Phosphorylierungsprodukte sind unter 10. als ANHANG 2 wiedergegeben.

6.3.1 Phosphorylierungsreaktion

Die Phosphorylierungsreaktion von Angiogenin, bFGF und Histon V S durch PKC in vitro wurde nach Aktivierung der PKC durch ihre Stimulatoren Ca^{2+} , Phosphatidylserin und Diolein durchgeführt. Als Phosphatdonor wurde ATP verwendet, dem zur Markierung der Phosphorylierungsprodukte ($\gamma\text{-}^{32}\text{P}$)ATP zugesetzt wurde. Zur Stabilisierung des Reaktionsmilieus wurde ein Tris-HCl Puffersystem, pH 7,5 zugefügt. Die Reaktionen wurden in Probenvolumina von 20 µl bis 400 µl bei 30 °C und variierenden Reaktionszeiten von 1 min bis zu 90 min (Standard: 30 min) durchgeführt. Zum Stoppen der Reaktion wurde EGTA 10 mM und Eisessig 99,9 % oder alternativ LAEMMLI-Puffer hinzugefügt (Beschreibung der Phosphorylierungsreaktion unter 10.1).

6.3.2 C18-HPLC (High-Pressure Liquid Chromatography)

C18 (Octadecyl) ist ein HPLC Sorbent für die Phasenumkehr-Chromatographie (reversed-phase chromatography), das durch die Reaktion von Silika-Gel mit n-Octadecyltrichlorosilan hergestellt wird. Nach Hydrolyse der überschüssigen Chlorgruppen werden die Hydroxylgruppen mit Trimethylsilylgruppen blockiert.

Die C18-HPLC-Säule wurde mit 70 % Lösung A (0,1 % TFA) und 30 % Lösung B (Azetonitril : Propanol : Wasser = 3 : 2 : 2 + 0,08 % TFA) äquilibriert. Die Elution der Proben erfolgte mit einem linearen Gradienten von 70 % Lsg. A und 30 % Lsg. B bis zu 50 % Lsg. A und 50 % Lsg. B über 60 min. bei einer Flußrate von 0,8 ml/min. Die optische Dichte der eluierten Fraktionen wurde kontinuierlich bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Die Radioaktivität der eluierten Fraktionen wurde in einem Flüssigkeits-Szintillations-Meßgerät gemessen (Beschreibung der Methode unter 10.2).

6.3.3 Mono S-HPLC

Die Mono S-HPLC-Säule wurde mit 85 % Lsg. A' (10 mM Tris-HCl, pH 8,0) und 15 % Lsg. B' (10 mM Tris-HCl, pH 8,0 + 1,0 M NaCl) äquilibriert. Die C18-HPLC Fraktionen wurden mit 2 M Tris-HCl auf einen pH von 8,0 eingestellt. Die Elution der Proben erfolgte mit einem linearen Gradienten von 85 % Lsg. A' und 15 % Lsg. B' bis zu 45 % Lsg. A' und 55 % Lsg. B' über 50 min. bei einer Flußrate von 0,8 ml/min. Die optische Dichte der eluierten Fraktionen wurde kontinuierlich bei einer Wellenlänge von 254 nm gemessen. Die Radioaktivität der eluierten Fraktionen wurde in einem Flüssigkeits-Szintillations-Meßgerät gemessen (Beschreibung der Methode unter 10.3).

6.3.4 Saure Proteinfällung

Die saure Proteinfällung wurde auf BIORAD Filterpapier mit 10 %-iger TCA, die 10 mM Natrium-Pyrophosphat enthielt, durchgeführt (Beschreibung der Methode unter 10.4).

6.3.5 SEPHADEX G25 Molekularsiebsäulenzentrifugation

Nach einer modifizierten Methode von Soo-Ik Chang wurde die Probe, der zur Stabilisierung 0,4 % Rinderserumalbumin als Trägerprotein zugesetzt waren, auf Minisäulen gequollenen SEPHADEX G25 aufgetragen und in präparierten Chem-tubes bei 700–1200 x g für 3–5 min. bei +4 °C zentrifugiert (Beschreibung der Methode unter 10.5).

6.3.6 CENTRICON 10 Membranfilterzentrifugation

Zur Konzentrierung der Phosphorylierungsprodukte und der Separation von freiem, überschüssigem ATP und (γ -³²P)ATP wurden die Proben in ein Centricon-10 Mikro-

Konzentrationsröhrchen pipettiert und nach Zugabe von jeweils 1,0 ml eiskalter Essigsäure-EGTA-Lsg. 2x 20 min bei 4500 x g und +4 °C zentrifugiert. Zur Sammlung des Konzentrates wurde jedes Centricon-10 Mikro-Konzentrationsröhrchen bei 500 x g 2 min. lang invertiert zentrifugiert (Beschreibung der Methode unter 10.6).

6.3.7 SDS-PAGE

Die Sodium-Dodecyl-Sulfat Poly-Acryl-Gel-Elektrophorese wurde modifiziert nach der unter Laemmli (1970) und Garfin (1990) beschriebenen Methode durchgeführt (Beschreibung der Methode unter 10.7).

6.3.8 Messung der ^{32}P -Aktivität

Beschreibung der Methode unter 10.8.

6.3.9 Berechnung der ^{32}P -Aktivität

Beschreibung der Methode unter 10.9.

6.4 Ergebnisse

6.4.1 Reinigungsschritte PKC-phosphorylierter Proteine

Die Reinigungsschritte und Separationsstufen ^{32}P -phosphorylierter Proteine zur Abtrennung überschüssigen ^{32}P -Phosphors und zur Isolierung phosphorylierten Proteins von nativem, unphosphoryliertem Substrat sind schematisch in der ABB. 30 dargestellt. Die Ergebnisse der einzelnen Verfahren werden nachstehend vorgestellt. Erst die wechselnde Kombinierung verschiedener Verfahren ermöglichte die für den speziellen Zweck notwendige Aussage. So war die SDS-Gelelektrophorese gut geeignet für analytische Fragestellungen, z. B. um die Reinheit und die Menge des phosphorylierten Proteins darzustellen und sein Molekulargewicht festzustellen (ABB. 33). Zur Darstellung und Trennung phosphorylierter Substratfragmente zeigte sich dieses Verfahren ebenfalls gut geeignet (ABB. 33–36). Die Trennung des unphosphorylierten vom phosphorylierten Substrat gelang mit dieser Methode nicht (ABB. 33–36). Zur effektiven Nutzung der Gelelektrophorese war die vorherige Abtrennung freien radioaktiven Phosphors erforderlich, wie die ABB. 41B(I) zeigt. Dies konnte effektiv mit der CENTRICON 10 Membranfilterzentrifugation der PKC-phosphorylierten Substrate vor SDS-Gelelektrophorese erreicht werden, wie die ABB. 41B(II) beweist. Zur Präparation größerer Mengen reinen phosphorylierten Substrates eigneten sich die C18-HPLC-Verfahren (ABB. 31, 32, 43). Die Trennung unphosphorylierten, nativen Angiogenins von phosphoryliertem Angiogenin gelang durch die Hintereinanderschaltung mehrerer HPLC Durchgänge. Phosphoryliertes Angiogenin wird etwas früher eluiert als unphosphoryliertes (ABB. 31). Der Nachteil der

Verdünnung der ^{32}P -phosphorylierten Proteine konnte über eine Rekonzentrierung durch CENTRICON 10 Membranfilterzentrifugation kompensiert werden. Aber neben der Verdünnung kommt es durch die Hintereinanderschaltung mehrerer HPLC-Reinigungsschritte auch zu einem gewissen Aktivitätsverlust phosphorylierten Angiogenins (ABB. 43). Als problematisch erwies sich die Mono S-HPLC als Reinigungsschritt für ^{32}P -Angiogenin. Wenn die Mono S-HPLC-Elutionsfraktionen, die das phosphorylierte ^{32}P -Angiogenin enthielten, nicht sofort vom Mono S-HPLC-Verfahren bedingten alkalischen Milieu mit einem pH um 8,0 durch Rekonzentrierung mittels CENTRICON 10 Membranfilterzentrifugation und Anhebung des pH-Wertes auf 6,5–6,8 stabilisiert wurden, war innerhalb kurzer Zeit (30–60 min.) kein ^{32}P -Angiogenin mehr nachweisbar. ^{32}P -Angiogenin scheint in alkalischem Milieu nicht stabil zu sein. Nach der Abtrennung überschüssigen, freien ^{32}P -Phosphors durch CENTRICON 10 Membranfilterzentrifugation stellte sich die saure Proteinfällung als einfache und zuverlässige Methode für analytische Zwecke dar. Es ließen sich gut reproduzierbare Ergebnisse und eine mit den anderen Verfahren vergleichbar genaue Quantifizierung phosphorylierter Proteine erzielen (ABB. 37). Für präparative Zwecke erwies sich die CENTRICON 10 Membranfilterzentrifugation als einfachste und ausreichend effektive Methode, um schonend überschüssigen, freien radioaktiven Phosphor und phosphorylierte Proteinfragmente, sowie Verunreinigungen vom phosphorylierten Protein zu trennen. Gleichzeitig konnte eine Konzentrierung und Volumenreduktion erreicht werden (ABB. 37). Dabei erwies sich die CENTRICON 10 Membranfilterzentrifugation der SEPHADEX G25 Molekularsiebsäulenzentrifugation in Bezug auf die Handhabung und die Effektivität als überlegen (ABB. 38). Die Trennung phosphorylierten Angiogenins von unphosphoryliertem, nativen Angiogenin war mit diesen beiden Methoden nicht möglich, sondern nur mit einer Kaskade von C18- und Mono S-HPLC.

6.4.2 C18-HPLC und Mono S-HPLC phosphorylierten Angiogenins

Nach Durchführung und Stoppen der Phosphorylierungsreaktion von Angiogenin durch PKC, wie unter Absatz 10.1 beschrieben, wurde eine Fraktionierung mittels C18-HPLC zur Abtrennung von freiem, überschüssigem ATP und von Proteinfragmenten durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß ^{32}P -Angiogenin unter den in Kapitel 10.2.3 beschriebenen Elutionsbedingungen nach 14 min. von der Säule gewaschen wurde (ABB. 31A: 2. radioaktiver Peak), während natives, unphosphoryliertes Angiogenin unter denselben Bedingungen nach 19 min. eluiert wurde (ABB. 31A: Pfeil). Phosphorylierte Proteinfragmente und freies ATP kamen bereits nach 3–8 min. von der C18-HPLC-Säule (ABB. 31A: 1. radioaktiver Peak). Wie die gleichzeitige Messung der optischen Dichte bei 254 nm (graue Kurve in ABB. 31A) des C18-HPLC Eluates ergab, gehen die gemessenen radioaktiven Peaks mit entsprechenden Peaks der optischen Dichte im Eluat einher. Den eluierten radioaktiven Peaks entsprechen Proteinbanden. Die SDS-Gelelektrophorese der gepoolten Fraktionen 14–20 (siehe ABB. 31A: Gepoolte Fraktionen für Mono S-HPLC) bestätigte, daß der 2. radioaktive Peak der HPLC-Fraktionierung phosphoryliertem Angiogenin entspricht (ABB. 43). Im Bereich der eluierten Fraktionen 18–20 min. nach Elutionsbeginn läßt sich keine Absorption messen. Dem Elutionszeitpunkt nativen, unphosphorylierten Angiogenins entsprechend findet sich kein Peak bei der Messung der optischen Dichte, sodaß nativ verbliebenes, unphosphoryliertes Angiogenin zusammen mit dem

phosphorylierten Angiogenin eluiert worden sein muß, da die erzielte Phosphorylierungsrate nicht 100 % sondern für Angiogenin maximal bei 30–49 % lag (ABB. 42; TABELLE 8).

6.4.3 SDS-Gelelektrophorese PKC-phosphorylierter Proteine

Die SDS-Gelelektrophorese zur Darstellung PKC-phosphorylierter Proteine wurde modifiziert nach Laemmli (1970) und Garfin (1990) durchgeführt. In der ABB. 30A ist die Reinheit der aus Rattenhirnen isolierten PKC nach SDS-PAGE 15 % dargestellt. Die PKC stellt sich als einzelne scharfe Proteinbande dar. Das Molekulargewicht liegt bei ca. 80000 Da und entspricht dem von anderen Autoren ermittelten Molekulargewicht für die PKC (TABELLE 9). In der ABB. 30B ist sehr gut die Autophosphorylierung der PKC in der 12,5 %-igen SDS-PAGE zu erkennen. In Anwesenheit der Stimulatoren (Ca^{2+} , Phospholipid und Diacylglycerin) und niedriger Konzentration der PKC im Reaktionsansatz wurden ca. 2 Mol Phosphat pro Mol PKC inkorporiert (TABELLE 8). Bei hoher PKC-Konzentration im Reaktionsansatz betrug die Autophosphorylierung nur ca. 1 Mol Phosphat pro Mol PKC (TABELLE 8). Die Phosphorylierung von Angiogenin, aber auch von Histon und bFGF ist nur in Anwesenheit von PKC und ihrer Stimulatoren möglich (ABB. 30B, 33, 34, 36, 41). Wie sich in der SDS-Gelelektrophorese eindeutig nachweisen läßt, handelt es sich bei dem Phosphorylierungsprodukt eindeutig um ^{32}P -Angiogenin (ABB. 33). Im zellfreien Reaktionsansatz ist die Aktivierung der PKC durch die Stimulatoren Phosphatidylserin und Diolein unabdingbar (ABB. 33). Keine wesentlichen Unterschiede in der Stimulation der PKC fanden sich bei Ersetzen des Stimulators 1,2-Diolein gegen 1,3-Diolein (ABB. 34, TABELLE 7). Größeren Einfluß auf die PKC-Aktivität bei der Phosphorylierung von Angiogenin zeigte der Austausch des Puffers. Eine deutlich höhere PKC-Aktivität zeigte sich bei Verwendung von 50 mM Tris-Puffer anstelle von Puffer A (siehe unter Abschnitt 10.1.2 Reagenzien). Der Einfluß des Puffersystems und seiner Konzentration auf die PKC-Aktivität im Phosphorylierungsansatz ist in der ABB. 42 aufgezeigt und unter Abschnitt 6.4.7.4 beschrieben. Humanes Angiogenin, hergestellt aus rekombinanten *Escherichia coli* Zellen (hANG Hoechst) oder aus rekombinanten Baby Hamster Nierenzellen (BHK hANG), wird von der isolierten PKC phosphoryliert (ABB. 34, 35; TABELLE 7, 8). Unter optimalen Reaktionsbedingungen wurden von der PKC maximal 19 % hANG Hoechst, aber vom BHK hANG maximal 49 % phosphoryliert (TABELLE 8). Histon V S wird von der isolierten PKC ebenfalls effektiv phosphoryliert, wie die SDS-PAGE 15 % in ABB. 35 zeigt. Die Phosphorylierung von bFGF mit PKC zeigt die ABB. 36.

Substrat	ohne PKC		Hoechst hANG I				BHK hANG		
1,2-Diolein	+		+	+			+	+	
1,3-Diolein		+			+	+			
PKC in Puffer A	Ø	Ø	+		+		+		
PKC in 50 mM Tris	Ø	Ø		+		+		+	
³² P-Inkorporation (pmol)	2,9	1,4	21	29	16	29	14	21	SDS-PAGE
Phosphorylierungsrate (%)			6,0	8,5	4,6	8,6	4,2	6,1	
³² P-Inkorporation (pmol)	2,1	1,3	23	43	20	36	19	29	Protein-Präzipitation
Phosphorylierungsrate (%)			6,6	12,4	6,0	10,4	5,6	8,8	

TABELLE 7:

Vergleichende Bestimmung der Phosphorylierungsraten durch PKC mit saurer Proteinfällung und 15 % SDS-Gelelektrophorese (ABB. 34).

Phosphorylierungsreaktionsbedingungen: 30° C, 30 min. Die Phosphorylierungsrate wurde durch Messung der radioaktiven Banden der 15 %-igen SDS-Gelelektrophorese bestimmt.

Substrat	Substratmenge (pmol)	PKC (pmol)	³² P-Inkorporation (pmol)	Substratphosphorylierung (%)
hANG Hoechst Batch I (3,8 mg/ml)	35	1,875	3,2	9,14
	350	18,75	0,6	0,17
hANG Hoechst Batch II (2,7 mg/ml)	35	1,875	6,8	19,43
	350	18,75	9,6	2,74
BHK-hANG (1,8 mg/ml)	35	1,875	17,3	49,43
	350	18,75	127,8	36,51
PKC-Autophosphorylierung	Ø	1,875	4,3	230,00
	Ø	18,75	21,6	115,20

TABELLE 8:

PKC Selbstphosphorylierung und Phosphorylierung verschiedener Angiogenine durch PKC.

Phosphorylierungsreaktionsbedingungen: 30° C, 90 min. Die Phosphorylierungsrate wurde durch Messung der radioaktiven Banden der 15 %-igen SDS-Gelelektrophorese bestimmt.

Literaturstelle	Walton et al., 1987	Woodgett et al., 1987	Kole et al., 1988	Feige et al., 1989	Wise et al., 1982	Le Peuch et al., 1983	Uchida et al., 1984	Eigene Ergebnisse
PKC-Isolierung	Gehirn (Rind)	Gehirn (Ratte)	Gehirn (Ratte)	Gehirn (Rind)	Herz (Rind)	Gehirn (Ratte)	Niere (Kaninchen)	Gehirn (Ratte)
Molekulargewicht	77000-82000	78000-80000	keine Angabe	80000	83000	84000	80000-85000	80000
Ertrag	4-6 µg/g	1,5-2 µg/g			0,7 µg/g			0,84 µg/g
Spezifische Aktivität (Histon)	2,2 U/mg	3,1 U/mg			0,17 U/mg	0,85 U/mg	4,6 U/mg	2,7 U/mg
Reinigung	624x	1000x			15800x	300x	5846x	12445x
Recovery	18%	20-30%			1%	5%	10-25%	15%
PKC-Puffer	20mM Tris pH 7,5	20mM Tris pH 7,5	wie Woodgett et al., 1987	wie Walton et al., 1987	20mM Tris pH 7,5	20mM Hepes pH 7,5	10mM Mes pH 6,5	wie Walton et al., 1987
EGTA	2mM	1mM			10mM	2mM	2mM	
EDTA	2mM				2mM	0,5mM		
DTT	1mM					2mM	5mM	
β-ME		0,1%			50mM			
NaCl	1M	100mM			100mM	200mM	300mM KCl	
Glyzerin	16%	10%						
Glukose					34%	30%	1mg/ml RSA	
TritonX100	0,02%					0,1%		
PMSF							0,1mM	
PKC-Konz.	1mg/ml	0,5 mg/ml	0,5 mg/ml	1 mg/ml		9,6 µg/ml		100 µg/ml
Reaktionsansatz	20mM Hepes pH 7,4	20mM Hepes pH 7,5	wie Woodgett et al., 1987	10mM Tris pH 7,5	25mM Tris pH 7,5	20mM Hepes pH 7,5	25mM Tris pH 7,5	20mM Tris pH 7,5
Ansatzvol.	60 µl	20 µl	500 µl	20 µl	200 µl		100 µl	20-500 µl
EGTA	333 µM				0,2 mM		400 µM	0,5 mM
EDTA	333 µM						400 µM	0,5 mM
CaCl ₂	1,67 mM	0,5 mM		0,6 mM	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM	0,63 mM
MgCl ₂	10 mM	10 mM		10 mM	10 mM	10 mM	5 mM	7 mM
ATP	150 µM	100 µM		10 µM	100 µM	100 µM	20 µM	160 µM
Diolen		5 µg/ml		0,8 µg/ml		6 µg/ml	0,5 µg/ml	5 µg/ml
Phosp.-Serin	200 µg/ml	50 µg/ml		40 µg/ml	25 µg/ml	60 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml
Histon	1mg/ml (3S)	0,5 mg/ml (3S)			0,2 mg/ml (3S)	1 mg/ml (3S)	0,2 mg/ml (3S)	2,8 pmol/µl (5S)
bFGF				25 µg/ml				1,4 pmol/µl
Angiogenin								17,4 pmol/µl
PKC	67 µg/ml	250 µg/ml	4 µg/ml	250 ng/ml	1,25 µg/ml	1 µg/ml		6,6 µg/ml
Temperatur	30 °C	30 °C	22 °C	30 °C	30 °C	20 °C	30 °C	30 °C
Reaktionszeit	2-5 min	5 min	10 min	15 min	5-10 min	30 min	1 min	1-60 min
K _m (µM)		6,0 (Histon)		1,5 (bFGF)	4,4 (ATP) 0,6 (Histon)	3,0 (Histon)		10,0 (Histon) 50,0 (ANG) 3,3 (bFGF)
V _{max} (pmol/min/mg)		230 (Histon)		180 (bFGF)	830 (ATP)	770 (Histon)		66,7 (Histon) 100 (bFGF) 120 (ANG)

TABELLE 9:

Zusammenstellung der in vitro Reaktionsansätze und der Substrate der Phosphorylierungsreaktion verschiedener PKC-Präparationen anhand von Literaturangaben und eigenen Ergebnissen.

In der Tabelle verwendete Abkürzungen siehe GLOSSAR unter: 1.1 Abkürzungen.

6.4.4 Saure Proteinfällung PKC-phosphorylierter Proteine

Die Proteinfällung im sauren Milieu stellt eine einfache Methode dar, Proteine auf Filterpapier von anderen, z. B. niedermolekularen Substanzen zu trennen. Die Stärke dieser Methode liegt in seiner Einfachheit und der fehlenden Mengenbegrenzung. Die Resultate dieser Methode sind in den ABB. 37C, 42, 43 dargestellt. Wie die ABB. 37 erkennen läßt, ist die saure Proteinfällung geeignet, freies ATP von den Phosphorylierungssubstraten Angiogenin und Histon zu trennen. Die mit dieser Methode ermittelten Phosphorylierungsraten von Angiogenin und Histon, sind denen mit SDS-PAGE ermittelten vergleichbar. Wie die Ergebnisse zeigen, sind die Phosphorylierungsprodukte von Angiogenin und Histon im sauren Milieu stabil.

6.4.5 SEPHADEX G25 Molekularsiebsäulenzentrifugation PKC-phosphorylierter Proteine

Um bei der SDS-Gelelektrophorese PKC-phosphorylierter Proteine eine Überladung des Gels mit freiem ^{32}P -ATP und ^{32}P -Proteinbruchstücken (ABB. 41B (I)) zu vermeiden, ist die schnelle und einfache Vorabtrennung dieser Bestandteile anzustreben. Aufgrund der erheblichen Molekulargewichtsunterschiede zwischen freiem ATP (MG \approx 600) und den Phosphorylierungssubstraten Angiogenin (MG 14400), bzw. bFGF (MG 18000) und Histon (MG 21000) sind Verfahren basierend auf dem Molekularsiebprinzip (Porengröße) zur Vorseparation geeignet. Sephadex G25 (fein) mit einem Fraktionierungsbereich von einem Molekulargewicht von 1000–5000 ist zur Separierung für diesen Zweck geeignet. Moleküle mit einem MG $>$ 5000 passieren die Säule ungehindert, wobei die Passage durch Erhöhung der Sedimentationskraft auf 700–1200 x g noch beschleunigt wird. Die zentrifugierten SEPHADEX G25 "drop-through" Fraktionen mit den PKC-phosphorylierten Proteinen wurden, wie vorstehend im Absatz 6.4.4 beschrieben, durch saure Proteinfällung auf Filterpapier präzipitiert. Die proteingebundene ^{32}P -Aktivität wurde, wie unter Punkt 10.4.2 beschrieben, in einem Flüssigkeits-Szintillationsmeßapparat gemessen. Die Ergebnisse im Vergleich zu der nachstehend unter Punkt 6.4.6 beschriebenen CENTRICON 10 Membranfilterzentrifugation PKC-phosphorylierter Proteine sind in der ABB. 38 dargestellt. Für die Phosphorylierungsprodukte von Angiogenin und bFGF wurden für beide Trennmethoden vergleichbare Ergebnisse erzielt, wobei jedoch mit der CENTRICON 10 Membranfilterzentrifugation, sowohl für die Phosphorylierung von Angiogenin, als auch von bFGF nach der Separation ein höherer Ertrag an phosphoryliertem Protein nachgewiesen werden konnte (ABB. 38).

6.4.6 CENTRICON 10 Membranfilterzentrifugation PKC-phosphorylierter Proteine

Zur schnellen und einfachen Abtrennung von freiem ATP, sowie von Proteindetritus vom Substrat der PKC-Phosphorylierung wurde die CENTRICON 10 Membranfilterzentrifugation eingesetzt. Problemlos wurde mit dieser Methode eine Konzentrierung der Fraktionen erreicht mit Reduktion des Volumens pro Zentrifugendurchgang um 40–50 %. Die effektive und schonende Separation von freiem ATP und Proteinbruchstücken vom phosphorylierten Substrat (Angiogenin) zeigt die vor und nach CENTRICON 10 Membranfilterzentrifugation

durchgeführte SDS-Gelelektrophorese 15 % in ABB. 41. Der in ABB. 41B (I) die Banden überlagernde "radioaktive Schmierbelag" ist durch die, die Trennkapazität des SDS-Gels überschreitende Überladung mit freiem ^{32}P -ATP und ^{32}P -Proteinbruchstücken verursacht. Die Vorschaltung einer CENTRICON 10 Membranfilterzentrifugation der PKC-phosphorylierten Proteine zeigt die vollständige Entfernung des "Schmierbelags" bei unveränderten Proteinbanden, wie die ABB. 41B (II) eindeutig beweist. Die Coomassie Blue Färbung der Proteinbanden (ABB. 41A) vor (I) und nach (II) CENTRICON 10 Membranfilterzentrifugation zeigt verglichen mit den radioaktiven ^{32}P -Proteinbanden des Autoradiogramms (ABB. 41B) vor (I) und nach (II) CENTRICON 10 Membranfilterzentrifugation identische Banden, wie der Vergleich mit den Banden nativen Angiogenins (# 7, 8, 9) beweist.

6.4.7 Optimierung der Phosphorylierungsreaktion

Zur Optimierung der Phosphorylierungsreaktion wurde die Pufferspezifität der PKC zur Phosphorylierung verschiedener Substrate (Angiogenin, Histon V S) ausgetestet. Die Ergebnisse sind nachfolgend im Abschnitt 6.4.7.4 und in ABB. 42 zusammengefaßt. Zur weiteren Charakterisierung der Proteinphosphorylierung durch PKC wurde für Histon als Substrat eine Reaktionskinetik (Absatz 6.4.7.1, ABB. 39) erstellt und für die Substrate Angiogenin, bFGF und Histon die Michaelis-Konstante bestimmt (Absatz 6.4.7.2, ABB. 40). Der Einfluß des Abstoppens der Phosphorylierungsreaktion (Abschnitt 10.1.3) auf die Stabilität und den erzielten Ertrag der Phosphorylierungsprodukte ist in ABB. 37 aufgelistet. Sowohl phosphoryliertes Angiogenin, als auch Phospho-Histon zeigten eine größere Stabilität gegenüber weiteren Fraktionierungen, wenn die Phosphorylierungsreaktion mit LAEMMLI-Puffer anstelle von Eisessig/10 mM EGTA gestoppt wurde.

6.4.7.1 Zeitkinetik der Histon-Phosphorylierung durch PKC

In der ABB. 39 ist die Zeitkinetik der Phosphorylierung von Histon durch PKC bei wechselnden Substratkonzentrationen dargestellt. Unter optimalen Reaktionsbedingungen für die Phosphorylierungsreaktion wurden bei einer Konzentration der PKC im Reaktionsansatz von 2,5 µg/ml \Leftrightarrow 31,25 nM steigende Substratkonzentrationen von 0,00625 mg/ml (= 0,297 µM) Histon pro Reaktionsansatz über 0,0625 mg/ml (= 2,969 µM), 0,125 mg/ml (= 5,938 µM), 0,25 mg/ml (= 11,875 µM), bis 0,5 mg/ml (= 23,75 µM) zugesetzt. Die Inkubationszeiten wurden von 0–16 min. (0, 1, 2, 4, 8 und 16 min.) variiert. Die ^{32}P -Inkorporation in das Substrat wurde nach Abtrennen überschüssigen, freien ^{32}P -Phosphors mit der CENTRICON 10 Membranfilterzentrifugation nach saurer Proteinpräzipitation auf Filterpapier, wie unter Abschnitt 10.4 beschrieben, bestimmt. Es wurde die ^{32}P -Aktivität der Präzipitate unter Zugabe von 2 ml Econofloor^R in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler gemessen. Daraus wurde, wie unter Absatz 10.9 angegeben, die Menge phosphorylierten Substrates berechnet.

Bei niedrigen Substratkonzentrationen von weniger als 0,125 mg/ml Histon im Reaktionsansatz zeigt sich bereits nach einer Inkubationszeit von 4 min. ein Abfall der Menge phosphorylierten Substrates (ABB. 39). Erst bei Histonkonzentrationen von >0,125 mg/ml im Ansatz steigt mit längerer Reaktionszeit auch der Ertrag phosphorylierten Substrates. Da die Proteinkinase C un-

ter speziellen Bedingungen (Abwesenheit von ADP) auch als spezifische Phosphatase reagiert und zur Umkehrreaktion mit Dephosphorylierung des Substrates führt, scheint dieser Mechanismus bei niedriger Substratkonzentration von Histon eine wesentliche Rolle zu spielen. Durch die geringe Substratkonzentration wird entsprechend wenig ATP zu ADP verbraucht. Somit entsteht bei der Reaktion nicht genügend ADP, um die Phosphatase-Eigenschaften der Protein-Serinkinase PKC zu hemmen speziell bei der Phosphorylierung von Histon, wie dies bereits für fünf Proteinkinasen beschrieben ist (Kole et al., 1988).

6.4.7.2 Bestimmung der Michaelis-Konstante

Für die Substrate Angiogenin, basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor und Histon wurde die Michaelis-Konstante nach Lineweaver-Burk graphisch ermittelt (ABB. 40). Unter optimalen Reaktionsbedingungen bei einem Reaktionsansatzvolumen von 20 μ l (s. Abschnitt 10.1 Phosphorylierungsreaktion) wurden steigende Substratkonzentrationen bei einer Reaktionszeit von 2 min. und einer PKC-Konzentration im Reaktionsansatz von 31.25 nM zugegeben:

Substratkonzentration:

mg/ml	0,0313	0,0625	0,125	0,25	0,5
Histon (MG 21.000):					
μ M	1,49	2,97	5,94	11,88	23,75
Angiogenin (MG 14.400):					
μ M	2,17	4,34	8,68	17,36	34,72
bFGF (MG 18000):					
μ M	1,74	3,47	6,94	13,88	27,78

Die 32 P-Inkorporation in das Substrat wurde nach Abtrennen überschüssigen, freien 32 P-Phosphors mit der CENTRICON 10 Membranfilterzentrifugation parallel a) nach saurer Proteinpräzipitation auf Filterpapier und b) mit SDS-Gelelektrophorese 15 % bestimmt. Es wurde die 32 P-Aktivität der Präzipitate bzw. der entsprechenden Proteinbanden der SDS-Gelelektrophorese unter Zugabe von 2 ml Econofloor^R in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler gemessen. Daraus wurde, wie unter Absatz 10.9 beschrieben, die Menge phosphorylierten Substrates berechnet.

Bei guter Übereinstimmung der Werte, gemessen nach der Methode der sauren Proteinfällung mit denen, die durch die SDS-Gelelektrophorese erhalten wurden, ließen sich graphisch bei doppelt reziproker Darstellung nach Lineweaver-Burk folgende Michaelis-Konstanten ermitteln (ABB. 40):

Angiogenin $k_m = 50 \mu$ M, bFGF = 3,3 μ M, Histon V S = 10,0 μ M. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit lag dabei für die Phosphorylierung von Angiogenin bei $v_{max} = 120$ pmol/min/mg, von bFGF bei $v_{max} = 100$ pmol/min/mg und von Histon V S bei $v_{max} = 66,7$ pmol/min/mg.

6.4.7.3 Berechnung der spezifischen Aktivität der PKC

Als Phosphorylierungssubstrat der PKC diente bei der Berechnung der spezifischen Aktivität der isolierten PKC aus Rattengehirn Histon V S (MG \approx 21.000). Die Bestimmung phosphorylierten Histons erfolgte über den Einbau von ^{32}P nach der *Formel 5* (s. 10.9 Aktivitätsberechnung) unter der Voraussetzung, daß pro pmol Histon ein pmol Phosphat inkorporiert wird (Verhältnis 1:1). Überschüssiges freies ^{32}P wurde mittels saurer Proteinfällung (s. 10.4) bzw. Membranfilterzentrifugation (s. 10.6) entfernt. Unter optimalen Reaktionsbedingungen (s. 10.1 Phosphorylierungsreaktion) und Substratsättigung wurden im Reaktionsansatz (Volumen: 40 μl) von 1,25 pmol PKC (MG \approx 80.000) 270 pmol Histon pro Minute phosphoryliert. Daraus ergibt sich eine spezifische Aktivität für die PKC:

Formel zur Berechnung der spezifischen Enzymaktivität SEA:

$$SEA = \frac{SU}{EP} \quad (\text{Formel 6})$$

SU = Substratumsatz in $\mu\text{mol}/\text{min}$

EP = Enzymprotein in mg

oder in Enzymeinheiten ausgedrückt:

spezifische Aktivität der PKC = 2,7 U/mg

6.4.7.4 Pufferspezifität der Proteinphosphorylierung durch PKC

Die Pufferspezifität der Phosphorylierungsreaktion von Angiogenin und Histon V S durch PKC ist in der ABB. 42 dargestellt. Bei Reaktionszeiten von 30 min. zeigte 10 mM Hepes-Puffer, pH 7,5 für die Phosphorylierung von Angiogenin mit einer Phosphorylierungsrate von 30 %, vor 50 mM Tris-Puffer, pH 7,5 mit einer Phosphorylierungsrate von 20 % das beste Ergebnis. Bei Inkubationszeiten von 60 min. war 50 mM Tris-Puffer, pH 7,5 mit einer Angiogenin-Phosphorylierungsrate von 18 % allen anderen Puffern überlegen. Trotz doppelt so langer Reaktionszeit war die Phosphorylierungsrate von Angiogenin im Vergleich zum besten Resultat bei 30-minütiger Inkubation um 12 % geringer. Die gleichen Untersuchungen für die Phosphorylierung von Histon V S zeigten bei 30 min. Inkubationszeit eine eindeutige Präferenz für Hepes-Puffer. Die Phosphorylierungsrate von Histon lag bei 10 mM Hepes-Puffer, pH 7,5 bei 48 % und für 20 mM Hepes-Puffer, pH 7,5 bei 44 %, während als bestes Ergebnis mit Tris-Puffer nur 30 % mit 10 mM Tris-Puffer, pH 7,5 erreicht werden konnten. Bei einer Inkubationszeit von 60 min. wurde eine 30 bzw. 40 % Phosphorylierung von Histon mit 10 bzw. 20 mM Tris-Puffer, pH 7,5 erzielt. Bei der Verwendung von Hepes-Puffer wurden bei einer Inkubationszeit von 60 min. nur 27 % des Histons phosphoryliert, bei Verwendung von 10 mM Hepes-Puffer, pH 7,5 im Reaktionsansatz. Insgesamt zeigten sich bei der Phosphorylierung von Histon durch PKC bei einer Inkubationszeit von 30 min. höhere Phosphorylierungsraten als bei einer

Reaktionszeit von 60 min, wie dies für die Phosphorylierung von Angiogenin auch festgestellt werden konnte.

6.5 Diskussion

Die Herstellung molekular modifizierter biologischer und chemischer Schlüsselsubstanzen stellt eine bewährte und interessante Methode zur Identifizierung essentieller funktioneller Wirkgruppen aktiver Zentren eines Moleküls dar. Sie ermöglicht auch ihre Lokalisation im molekularen Gerüst der Substanz. Diese Experimente stellen einen wesentlichen Bestandteil bei der Aufklärung des molekularen Wirkungsmechanismus und seiner Regulation einer Substanz in biologischen Systemen dar.

Vielfältige gezielte Modifikationen der Struktur des Angiogeninmoleküls haben wertvolle Informationen über die Lokalisation funktioneller Gruppen und aktiver Zentren im Angiogeninmolekül gebracht (Bond et Vallee, 1990; Curran et al., 1993; Hallahan et al., 1991; Harper et Vallee, 1988; Harper et Vallee, 1989; Harper et al., 1990).

Anhand der Aminosäuresequenz von humanem Angiogenin (Strydom et al., 1985) ist die Aminosäure Serin⁵² (52. Stelle in der Aminosäuresequenz) der wahrscheinlichste Ort der Phosphorylierung durch PKC. Phospho-Serin ist im alkalischen Milieu bei pH-Werten um 8,0 nicht stabil (persönliche Mitteilung von Guofu F. Hu).

Die Instabilität von ³²P-Angiogenin in alkalischem Milieu bei pH-Werten um 8,0 ist wahrscheinlich durch die Instabilität der Phospho-Serinbindung zu erklären. Der Verlust an phosphoryliertem Angiogenin nach Mono S-HPLC Passage ließe sich damit erklären. Zur Separation von phosphoryliertem Angiogenin von nativem Angiogenin war jedoch eine Kaskade von C18-HPLC und Mono S-HPLC erforderlich. Für die Herstellung größerer Mengen phosphorylierten Angiogenins ist eine Verbesserung dieses Reinigungsschrittes erforderlich. Die Abtrennung überschüssigen freien Phosphors und niedermolekularer Bruchstücke ließ sich gut mit den Methoden der CENTRICON 10 Membranfilterzentrifugation und der SEPHADEX G25 Molekularsiebsäulenzentrifugation erreichen.

Mit der SDS Gelelektrophorese ließ sich eindeutig nachweisen, daß die aus Rattenhirnen isolierte PKC im optimierten Reaktionsansatz in Anwesenheit ihrer Stimulatoren Ca²⁺, Phosphatidylserin und Diolein in vitro sowohl humanes rekombinantes Angiogenin hergestellt aus *Escherichia coli* Zellen als auch rekombinantes humanes Angiogenin aus Baby Hamster Nierenzellen effektiv phosphorylierte. Mit BHK hANG wurden Phosphorylierungsraten bis 49 % erreicht. hANG Hoechst wurde maximal zu 30 % phosphoryliert. Weglassen der PKC-Stimulatoren im Reaktionsansatz führte zum vollständigen Verlust der PKC-Aktivität (ABB. 33). Auch ohne PKC ließ sich keine Phosphorylierung nachweisen (ABB. 33, 34, 36).

Die SDS Gelelektrophorese zeigte auch, daß insbesondere bei der Phosphorylierung von Angiogenin ein kleiner Anteil degradierten, fragmentierten ³²P-Angiogenins entsteht (ABB. 33). Ob es sich hierbei um eine Folge der Phosphorylierungsreaktion oder um ein Degradierungsprodukt handelt, daß durch die SDS-Gelelektrophorese entsteht, war nicht mit Sicherheit zu entscheiden. Parallelversuche mit Nachweis der Phosphorylierungsprodukte über eine saure Proteinfällung auf Filterpapier zeigten vergleichbare Resultate (Phosphorylierungsraten), die den Schluß nahe-

legen, daß die Degradierungsprodukte bei der Phosphorylierungsreaktion und nicht durch die SDS-Gelelektrophorese entstanden sind.

Die erforderlichen optimalen Reaktionsbedingungen zur Phosphorylierung von Angiogenin mit der isolierten PKC lassen sich mit den Erfahrungen anderer Autoren bei der Proteinphosphorylierung mit PKC vergleichen und sind tabellarisch nach einer Zusammenstellung aus der Literatur in der TABELLE 9 aufgelistet. Die spezifische Aktivität, der nach einer modifizierten Methode von Walton et al. (1987) aus Rattengehirn isolierten PKC, war mit 2,7 U/mg durchaus vergleichbar mit der anderer Isolationen (s. TABELLE 9).

Die Fähigkeit bFGF effektiv zu phosphorylieren, war auch ein Merkmal, die Eigenschaften und die Aktivität der isolierten PKC mit den Angaben anderer Autoren zu vergleichen (s. TABELLE 9, Spalte 5). Feige et al., (1989) fand bei der Phosphorylierung von bFGF mit PKC aus Rindergehirn ähnliche Ergebnisse, wie hier beschrieben. Die Phosphorylierung von bFGF in Zellkulturen wurde für zwei Zelllinien beschrieben: Humane Hepatomazellen und Kapillarendothelzellen der Nebenniere vom Rind (Feige et Baird, 1991). Dabei zeigte sich, daß phosphoryliertes bFGF teilweise eine höhere Affinität zu seinem Zellmembranrezeptor aufwies als unphosphoryliertes, wie mit Bindungsstudien von ^{125}I -bFGF an BHK-Zellen in Kultur gezeigt werden konnte. Neuere Beobachtungen bestätigten, daß atrialer natriuretischer Faktor, aFGF und bFGF als sezernierte Faktoren von intakten Zellen phosphoryliert werden (Feige et Baird, 1991). Die Phosphorylierung von intaktem bFGF durch PKC in vitro erfolgt durch Phosphorylierung der Aminosäure Ser⁶⁴, während fragmentiertes bFGF an der Stelle Ser¹⁰⁸ phosphoryliert wird (Feige et al., 1991). Auch in Zellkulturen von Kapillarendothelien wird durch PKC die Aminosäure Ser⁶⁴ im bFGF-Molekül phosphoryliert. Es zeigte aber keine höhere Affinität zum Rezeptor als natives unphosphoryliertes bFGF. Durch cAMP-abhängige PKA an der Aminosäure Thr¹¹² phosphoryliertes bFGF weist dagegen eine höhere Bindungsaffinität zum Rezeptor auf. Diese unterschiedliche Rezeptoraffinität könnte ein entscheidender Faktor in der Regulation der Signal Transduktion von bFGF sein (Feige et Baird, 1989). Für bFGF wurden auch enge Interaktionen mit Heparin, Fibronectin und Laminin unter dem Einfluß der Phosphorylierung durch PKC beschrieben (Feige et al., 1989). Obgleich die physiologische Bedeutung der Phosphorylierung von bFGF noch nicht eindeutig geklärt ist, zeigen die bisherigen Ergebnisse, daß die angiogenetischen Aktivitäten von bFGF und auch die komplexe Interaktion von bFGF mit Substanzen der extrazellulären Matrix über Phosphorylierungsprozesse mit PKC als zentralem Enzym beeinflußt werden.

Zur Untersuchung ähnlicher Regulationsprozesse der molekularen Aktivität von Angiogenin kann phosphoryliertes Angiogenin einen wertvollen Beitrag leisten. Angiogenin wird von Aktin in der Endothelzellmembran an Endothelzellen gebunden (Hu et al., 1991; Hu et al., 1993; Moroi et al., 1993). Dabei ist bisher nicht klar, ob die Aktin-Bindung einer Rezeptorbindung, wie sie für bFGF gesichert ist, entspricht. Wie Untersuchungen an glatten Muskelzellen aus der Aorta der Ratte zeigten, ist Angiogenin über die Stimulierung der Adenylat-Zyklase in der Lage PKC zu aktivieren (Xiao et al., 1989). Ähnliche biologische Aktivität von bFGF und Angiogenin, der Nachweis effektiver Phosphorylierung durch PKC in vitro, verbunden mit der neueren Erkenntnis, daß auch Angiogenin eine gewisse Affinität zu Heparin besitzt, lassen interessante weitere Untersuchungsergebnisse über die molekulare Bedeu-

tung von phosphoryliertem Angiogenin für die Moleküleigenschaften von Angiogenin erwarten. Ob die Phosphorylierung von Angiogenin durch PKC in vivo relevant ist und zentrale Bedeutung für die Signal-Transduktion der angiogenetischen Wirkung von Angiogenin besitzt, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig beantwortet werden.

6.6 Zusammenfassung

Proteinkinase C (PKC), isoliert aus Rattengehirnen nach einer Methode von Walton et al. (1987), ist in Anwesenheit ihrer Stimulatoren (Ca^{2+} , Phospholipid und Diacylglycerin) in der Lage humanes Angiogenin (hANG) in vitro zu phosphorylieren. Unter optimalen Reaktionsbedingungen ließen sich eine Angiogenin-Phosphorylierungsrate von 30 % (hANG Hoechst) bzw. 49 % (BHK hANG) erreichen. Damit war die Phosphorylierung von Angiogenin durch PKC weniger effektiv, als z. B. von humanem basischem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (hbFGF) oder Histon V S, die durch die PKC mit einer Effektivität von bis zu 84 % (hbFGF) und von bis zu 50 % (Histon V S) phosphoryliert wurden. Für die Phosphorylierung von Angiogenin durch PKC erwiesen sich 10 mM Hepes-Puffer, pH 7,5 oder 50 mM Tris-Puffer, pH 7,5 im Reaktionsansatz als optimal. Die Phosphorylierung von Histon V S durch PKC zeigte die besten Ergebnisse bei 10–20 mM Hepes-Puffer, pH 7,5 oder 10–20 mM Tris-Puffer, pH 7,5 im Reaktionsansatz. Die graphische Bestimmung der Michaelis-Konstante ergab folgende Werte: Angiogenin $k_m = 50 \mu\text{M}$, bFGF $k_m = 3,3 \mu\text{M}$, Histon V S $k_m = 10,0 \mu\text{M}$. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit lag dabei für die Phosphorylierung von Angiogenin bei $v_{\max} = 120 \text{ pmol/min/mg}$, von bFGF bei $v_{\max} = 100 \text{ pmol/min/mg}$ und von Histon V S bei $v_{\max} = 66,7 \text{ pmol/min/mg}$. Die spezifische Aktivität der PKC für die Phosphorylierung des Substrates Histon V S errechnete sich mit 2,7 U/mg. Die Zeitkinetik der PKC-Phosphorylierungsreaktion von Histon V S bei steigenden Substratkonzentrationen ergab, daß erst bei Substratüberschuß eine stabile Phosphorylierungsrate vorlag. Bei Substratkonzentrationen von weniger als 0,125 mg/ml (5,9 μM) Histon V S kam es bereits nach einer Reaktionszeit von mehr als 2 min. zu einem deutlichen Abfall phosphorylierten Histon V S. Die Abtrennung überschüssigen ^{32}P -Phosphors und degradierten Proteinprodukte vom phosphorylierten Protein war einfach und effektiv mit der CENTRICON 10 Membranfilterzentrifugation möglich. Im Vergleich mit der SEPHADEX G25 Molekularsiebsäulenzentrifugation erwies sich diese Methode in der Handhabung und in der Ausbeute phosphorylierten bFGFs und Angiogenins als überlegen. Die Analyse der Phosphorylierungsprodukte mit der SDS-Gelelektrophorese zeigte eindeutig, daß es sich um phosphoryliertes Angiogenin, bFGF, bzw. Histon V S handelte. Zur Separation phosphorylierten von nativem, unphosphoryliertem Angiogenin waren weder CENTRICON 10 Membranfilterzentrifugation, SEPHADEX G25 Molekularsiebsäulenzentrifugation, noch die SDS-Gelelektrophorese geeignet. Nur mit fraktionierter HPLC war eine Trennung möglich. Bei der Kombination von C18-HPLC und Mono S-HPLC war ein teilweiser Zerfall von ^{32}P -Angiogenin, daß bei dem alkalischen pH von 8,0 der Mono S-HPLC Fraktionierung instabil ist, nicht zu verhindern. Die Hintereinanderschaltung mehrerer C18-HPLC Fraktionierungen war mit einem Verlust von bis zu 70 % des phosphorylierten Angiogenins verbunden. Aufgrund der erheblichen Verdünnung der Fraktionen waren mehrfach Zwischenschritte zur Rekonzentrierung notwendig, die wahrscheinlich den Verlust mit bedingten.

7. ZUSAMMENFASSUNG:

In der vorliegenden Arbeit wurden einige Aspekte der Angiogenese unter besonderer Berücksichtigung des Wachstumsfaktors Angiogenin untersucht.

In der Sektion I der Arbeit wird ein standardisiertes Tiermodell in der Ratte vorgestellt, das die Wirkung angiogenetischer Faktoren zur Stimulierung der Angiogenese in ischämischen Geweben quantitativ erfaßt. Damit wurde ein in vivo Modell geschaffen, das die quantitative Beurteilung der therapeutischen Effekte von lokal applizierten Wachstumsfaktoren zur indirekten Revaskularisation ischämischer Gewebe erlaubt. Bereits 1,9 ng des Wachstumsfaktors Angiogenin, lokal appliziert, stimulierten 07 Tage nach Ischämieinduktion die Angiogenese signifikant. Gesamtgefäßanzahl und Kapillaren pro mm² waren nach Angiogeningabe signifikant höher. Langzeitbeobachtungen bis 70 Tage nach Ischämieinduktion zeigten, daß die Regulation der Angiogenese einer gedämpften sinusförmigen Schwingung entspricht, deren Amplitude und Frequenz durch Angiogeninapplikation im Vergleich zu den Kontrollen deutlich gesteigert wurde. Dieser Trend ließ sich abgeschwächt auch bei alleiniger lokaler Applikation von Collagen I ohne Gabe eines Wachstumsfaktors nachweisen. Bei dem Vergleich der Dosis-Wirkungsbeziehung von Angiogenin und basischem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) erwies sich Angiogenin zur Stimulation der indirekten Revaskularisation 2,5-mal potenter. 10 ng Angiogenin stimulierten signifikant die Angiogenese 07 Tage nach Applikation. 250 ng bFGF und 100 ng Angiogenin stimulierten jeweils hoch signifikant die Gefäßneubildung. Der initiale angiogenetische Effekt von bFGF und Angiogenin beruht auf der Neubildung hauptsächlich von Kapillaren.

In der Sektion II wird eine Methode zur Beschichtung kleinkalibriger Gefäßprothesen mit Wachstumsfaktoren beschrieben und ein Tiermodell in White New Zealand Kaninchen zur Testung der Offenheitsrate der Gefäßprothesen in vivo vorgestellt. Die "patency rate" der implantierten 5 cm langen und im Durchmesser 2 mm messenden PTFE-Prothesen war auch mit angiogenetischer Beschichtung für klinische Zwecke nicht ausreichend. Offenheitsraten von 24 Stunden wurden mit der kombinierten angiogenetischen Beschichtung der Prothesen mit 1 µg bFGF und 285 µg Angiogenin erreicht. Alle anderen Beschichtungen zeigten eine wesentlich kürzere Offenheitsrate. Prothesen mit alleiniger Angiogeninbeschichtung (285 µg) blieben 8 Stunden offen. Prothesen mit alleiniger Beschichtung mit bFGF (1 µg) waren bereits nach 6 Stunden verschlossen. Die schlechteste Offenheitsrate mit nur 2 Stunden bzw. nur 1 Stunde wiesen die nur mit Heparin (100 E) bzw. nur mit Gelatine beschichteten Prothesen auf. Die Verwendung des Matrixfaktors Gelatine als Träger der Angiogenesefaktoren zur Beschichtung der Prothesen war aufgrund seiner hohen Thrombogenität hauptsächlich für die schlechte Offenheitsrate verantwortlich.

In der Sektion III wird eine Methode zur Herstellung modifizierten Angiogenins vorgestellt. Durch Phosphorylierung der Aminosäure Serin im Angiogeninmolekül durch Proteinkinase C, ließ sich ein weniger kationisches Angiogenin in vitro herstellen, daß im alkalischen Milieu (bei pH 8) instabil war. Mit der Phosphorylierung durch Proteinkinase C ließen sich Phosphorylierungsraten für Angiogenin von bis zu 49 % erzielen. Höhere Phosphorylierungs-

raten wurden mit der Proteinkinase C bei der Phosphorylierung von Histon V S mit über 50 % und von bFGF mit 84 % erzielt. Die spezifische Aktivität der Proteinkinase C betrug 2,7 $\mu\text{mol/min/mg}$ bei Histon V S als Substrat. Die Michaelis-Konstanten wurden für Angiogenin mit $k_m = 50 \mu\text{M}$, für bFGF mit $k_m = 3,3 \mu\text{M}$ und für Histon V S mit $k_m = 10,0 \mu\text{M}$ bestimmt. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit lag dabei für die Phosphorylierung von Angiogenin bei $v_{\max} = 120 \text{ pmol/min/mg}$, von bFGF bei $v_{\max} = 100 \text{ pmol/min/mg}$ und von Histon V S bei $v_{\max} = 66,7 \text{ nmol/min/mg}$.

Die im Abschnitt 3 formulierten Fragen 1–12 lassen sich zusammenfassend wie folgt beantworten:

1. Ist die Wirkung angiogenetischer Faktoren in einem standardisierten Tiermodell quantifizierbar?
Ja. Das an männlichen Lewis Inzuchtratten standardisierte Tiermodell erlaubt die quantitative Untersuchung der angiogenetischen Potenz von Wachstumsfaktoren zur indirekten Revaskularisierung ischämischer Gewebe in vivo.
2. Welche Langzeitwirkung hat Angiogenin in vivo bei der Revaskularisierung ischämischer Gewebe im standardisierten Tiermodell?
Die initiale Stimulation der Angiogenese 07–14 Tage nach Applikation von Angiogenin besteht in der Neubildung von Kapillaren. Im weiteren Verlauf tritt die Zunahme der Präkapillaren in den Vordergrund.
3. Über welchen Zeitraum lassen sich im standardisierten Tiermodell in vivo angiogenetische Effekte von lokal appliziertem Angiogenin nachweisen?
1,9 ng Angiogenin stimulierten die Angiogenese 07 Tage nach Applikation signifikant ($p \leq 0,05$). Bis 70 Tage nach der Gabe von Angiogenin war im Vergleich zu den Kontrollen eine Stimulation der Angiogenese erkennbar.
4. Gibt es für die angiogenetische Wirkung von Angiogenin und bFGF in vivo eine Dosis-Wirkungsbeziehung?
Ja. Im vorliegenden Tiermodell betrug die optimale Dosis zur Stimulation der Angiogenese für bFGF 250 ng. Für Angiogenin lag die optimale Dosis zwischen 10 und 100 ng.
5. Sind Angiogenin und bFGF in ihrer angiogenetischen Potenz gleich? Wenn nicht, worin unterscheiden sie sich?
Angiogenin erwies sich als 2,5-mal stärker gefäßneubildend als bFGF im vorliegenden Tiermodell. Beide Wachstumsfaktoren stimulierten in optimaler Dosis die Angiogenese 07 Tage nach Ischämieinduktion hoch signifikant ($P < 0,002$). Der initiale Effekt beider Wachstumsfaktoren bestand in einer Stimulierung der Neubildung von Kapillaren.
6. Lassen sich die angiogenetische Wirkung von bFGF und Angiogenin zur indirekten Vaskularisierung nutzen?
Die Anwendung von rekombinantem humanem Angiogenin und bFGF wies für beide Wachstumsfaktoren eine ausgeprägte Stimulation der indirekten Revaskularisation im

verwendeten Tiermodell nach. Eine gleichartige, jedoch möglicherweise nicht gleich starke Reaktion ist bei der Anwendung dieser humanen Wachstumsfaktoren am Menschen zu erwarten. Ein Ausnutzen der angiogenetischen Potenz dieser Faktoren zur gezielten therapeutischen Stimulation der indirekten Revaskularisation beim Menschen, z. B. bei Durchblutungsstörungen des Herzens oder anderer Körperregionen erscheint sinnvoll und vielversprechend.

7. Sind angiogenetische Faktoren, insbesondere Angiogenin und bFGF allein oder in Kombination zur Verbesserung der Biokompatibilität schmallumiger synthetischer, nicht biologischer Gefäßprothesen geeignet?

Bei insgesamt für klinische Zwecke noch unbefriedigender Offenheitsrate der angiogenetisch beschichteten PTFE-Prothesen mit einem Durchmesser von 2 mm war eindeutig zu erkennen, daß die Kombination von Angiogenin und bFGF der alleinigen Beschichtung mit nur einem Wachstumsfaktor oder nur mit Heparin überlegen ist.

8. Ist mit angiogenetisch beschichteten Gefäßprothesen eine Endothelialisierung der Prothese in vivo und in situ möglich?

Die erzielten Resultate mit angiogenetisch beschichteten Gefäßprothesen ließen keine in vivo/in situ Endothelialisierung an den implantierten Prothesen aufgrund der schlechten Offenheitsrate von maximal 24 Stunden nachweisen. Weitere Untersuchungen mit weniger thrombogenen Matrixfaktoren in der Kombination auch mit anderen Wachstumsfaktoren werden sicher neue Erkenntnisse bringen.

9. Ist die Modifizierung des Angiogeninmoleküls durch Phosphorylierung mit Proteinkinase C in vitro möglich?

Ja. Proteinkinase C war in einem optimierten Phosphorylierungsansatz unter Verwendung ihrer Stimulatoren Ca^{2+} , Phosphatidylserin und Diolein in der Lage Angiogenin mit einer Effektivität von bis zu 50 % in vitro zu phosphorylieren.

10. Mit welchen Methoden läßt sich phosphoryliertes Angiogenin nachweisen?

Mit der SDS-PAGE ist bei Verwendung von $(\gamma\text{-}^{32}\text{P})\text{ATP}$ als Phosphatdonator der Phosphorylierungsreaktion phosphoryliertes Angiogenin als ^{32}P -Angiogenin qualitativ und quantitativ nachweisbar.

11. Welche Methoden sind geeignet phosphoryliertes Angiogenin zu isolieren und zu reinigen?

Zur Separation von niedermolekularen Verunreinigungen und von überschüssigem Phosphor sind für präparative Zwecke die SEPHADEX G25 Molekularsiebsäulenzentrifugation und die CENTRICON 10 Membranfilterzentrifugation geeignet. Mit der sauren Proteinfällung ließ sich am einfachsten die quantitative Bestimmung phosphorylierten Angiogenins durchführen.

12. Stellt die Phosphorylierung von Angiogenin durch PKC möglicherweise eine physiologische Reaktion in der Wirkungskette von Angiogenin dar?

Zur Beantwortung dieser Frage sind weitere Versuche in vivo und in vitro erforderlich. Bisherige Hinweise auf die zentrale Funktion der Proteinkinase C in vielen intra/extrazellulären Informationsübertragungsprozessen ("second messenger" Reaktionen und "signalling" Prozesse) führen aufgrund der guten Phosphorylierbarkeit von Angiogenin durch PKC zu der Vermutung, daß die Phosphorylierung von Angiogenin durch PKC auch in vivo eine Rolle spielt. Möglicherweise stellt die Phosphorylierung von Angiogenin im molekularen Wirkungsmechanismus von Angiogenin auf der zellulären Ebene z. B. bei der extra/intrazellulären Informationsübertragung, oder bei der Modifizierung der biologischen Aktivität, evtl. auch bei der Inaktivierung von Angiogenin eine zentrale Schlüsselreaktion dar.

Die präsentierten Ergebnisse zeigen, daß Angiogenin ein potenter Stimulator der indirekten Revaskularisierung in vivo ist und die Wirkung im standardisierten Tiermodell an der Ratte quantitativ untersucht werden kann. Die Offenheitsrate kleinkalibriger (\varnothing 2 mm) PTFE-Gefäßprothesen läßt sich im entwickelten Tiermodell an White New Zealand Kaninchen in vivo testen. Die angiogenetische Beschichtung der Prothesen mit dem Matrixfaktor Gelatine als Trägersubstanz der Angiogenesefaktoren und mit Heparin, Angiogenin und bFGF als Mitogenen zeigte keine für klinische Fragestellungen akzeptable Offenheitsrate. Mit der Phosphorylierung von Angiogenin durch Proteinkinase C in vitro unter Verwendung ihrer Stimulatoren Ca^{2+} , Phospholipid und Diolein konnten Phosphorylierungsraten von bis zu 50 % erzielt werden. Mit phosphoryliertem Angiogenin steht nun ein weiterer molekular veränderter Wachstumsfaktor für Untersuchungen seiner biologischen Eigenschaften und der angiogenetischen Potenz in vivo und in vitro zur Verfügung.

8. LITERATURVERZEICHNIS

Aftab DT, Hait WN.

A semiautomated 96-well plate assay for protein kinase C.

Anal Biochem 187: 84–8, 1990

Akira K, Ando J.

Vascular endothelial cell functions and biomechanics.

Endothelium 1(2):127–30, 1993

Ausprunk DH, Folkman J.

Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis.

Microvasc Res 14(1): 53–66, 1977

Badet J, Soncin F, Guitton JD, Lamare O, Cartwright T, Barritault D.

Specific binding of angiogenin to calf pulmonary artery endothelial cells.

Proc Natl Acad Sci USA 86: 8427–31, 1989

Baffour R, Berman J, Garb JL, Rhee SW, Kaufman J, Friedmann P.

Enhanced angiogenesis and growth of collaterals by in vivo administration of recombinant basic fibroblast growth factor in a rabbit model of acute lower limb ischemia: Dose-response effect of basic fibroblast growth factor.

J Vasc Surg 16: 181–91, 1992

Banchero N.

Cardiovascular responses to chronic hypoxia.

Ann Rev Physiol 49: 465–76, 1987

Bashkin P, Doctrow S, Klagsbrun M, Svahn CM, Folkman J, Vlodavsky I.

Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix and is released by heparitinase and heparin-like molecules.

Biochem 28: 1737–43, 1989

Betz E.

Arterioskleroseforschung am Tiermodell und an Zellkulturen.

Z Kardiol 80(Suppl 9): 7–13, 1991

Bicknell R, Vallee BL.

Angiogenin activates endothelial cell phospholipase C.

Proc Natl Acad Sci USA 85: 5961–5965, 1988

Bitte L, Kabat D.

Isotopic labeling and analysis of phosphoproteins from mammalian ribosomes.

In: "RNA and protein synthesis", Academic Press Inc: 703–31, 1981

Bond MD, Vallee BL.

Replacement of residues 8–22 of angiogenin with 7–21 of RNase A selectively affects protein synthesis inhibition and angiogenesis.

Biochemistry 29(13): 3341–9, 1990

Bond MD, Vallee BL.

Isolation and sequencing of mouse angiogenin DNA.

Biochem Biophys Res Commun 171(3): 988–95, 1990

Bond MD, Strydom DJ.

Amino acid sequence of bovine angiogenin.

Biochemistry 28(14): 6110–3, 1989

Bond MD, Strydom DJ, Vallee BL.

Characterization and sequencing of rabbit, pig and mouse angiogenins: Discernment of functionally important residues and regions.

Biochim Biophys Acta 1162(1–2): 177–86, 1993

Booyse FM, Sedlak BJ, Rafelson ME.

Culture of arterial endothelial cells. Characterization and growth of bovine aortic cells.

Thrombos Diathes haemorrh 34: 825–39, 1975

Bradham DM, in der Wiesche B, Precht P, Balakir R, Horton W.

Transrepression of type II collagen by TGF-beta and FGF is protein kinase C dependent and is mediated through regulatory sequences in the promoter and first intron.

J Cell Physiol 158(1): 61–8, 1994

Burgess WH, Maciag T.

The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins.

Annu Rev Biochem 58: 575–606, 1989

Callow, AD, Choi ET, Trachtenberg JD, Stevens SL, Connolly DT, Rodi C, Ryan US.

Vascular permeability factor accelerates endothelial regrowth following balloon angioplasty.

Growth Factors 10: 223–8, 1994

Caveda L, Corada M, Padura IM, Del Maschio A, Breviario F, Lampugnani MG, Dejana E.

Structural characteristics and functional role of endothelial cell to cell junctions.

Endothelium 2(1): 1–10, 1994

- Cicutti N, Rakusan K, Downey HF.
Colored microspheres reveal interarterial microvascular anastomoses in canine myocardium.
Basic Res Cardiol 87: 400–9, 1992
- Curran TP, Shapiro R, Riordan JF.
Alteration of the enzymatic specificity of human angiogenin by site-directed mutagenesis.
Biochemistry 32(9): 2307–13, 1993
- D'Amore PA, Thompson RW.
Mechanisms of angiogenesis.
Ann Rev Physiol 49: 453–464, 1987
- Davidson J, Buckley A, Woodward S, Nichols W, McGee G, Demetriou A.
Mechanisms of accelerated wound repair using epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor.
In: "Growth factors and other aspects of wound healing: Biological and Clinical Implications", Alan R. Liss, Inc.: 63–75, 1988
- Delvos U, Gajdusek C, Sage H, Harker LA, Schwartz SM.
Interaction of vascular wall cells with collagen gels.
Lab Invest 46(1): 61–72, 1982
- Dono R, Zeller R.
Cell-type-specific nuclear translocation of fibroblast growth factor-2 isoforms during chicken kidney and limb morphogenesis.
Dev Biol 163(2): 316–30, 1994
- Endoh M, Pulsinelli WA, Wagner JA.
Transient global ischemia induces dynamic changes in the expression of bFGF and the FGF receptor.
Brain Res Mol Brain Res 22(1–4): 76–88, 1994
- Engbers GH, Feijen J.
Current techniques to improve the blood compatibility of biomaterial surfaces.
Int J Artif Organs 14(4): 199–215, 1991
- Ehrmann RL, Knoth M.
Choriocarcinoma. Transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster cheek pouch. Studied by light and electron microscopy.
J Natl Cancer Inst 41(6): 1329–1341, 1968

El-Fakahany EE, Alger BE, Lai WS, Pitler TA, Worley PF, Baraban JM.
Neuronal muscarinic responses: Role of protein kinase C.
FASEB J 2: 2575–83, 1988

Fasol R, Zilla P, Groscurth P, Wolner E, Moser R.
Experimental in vitro cultivation of human endothelial cells on artificial surfaces.
Trans Am Soc Artif Intern Organs 31: 276–83, 1985

Fasol R, Zilla P, Deutsch M, Grimm M, Fischlein T, Laufer G.
Human endothelial cell seeding: Evaluation of its effectiveness by platelet parameters after one year.
J Vasc Surg 9: 432–6, 1989

Feige JJ, Baird A.
Basic fibroblast growth factor is a substrate for protein phosphorylation and is phosphorylated by capillary endothelial cells in culture.
Proc Natl Acad Sci USA 86: 3174–8, 1989

Feige JJ, Bradley JD, Fryburg K, Farris J, Cousens LC, Barr PJ, Baird A.
Differential effects of heparin, fibronectin, and laminin on the phosphorylation of basic fibroblast growth factor by protein kinase C and the catalytic subunit of protein kinase A.
J Cell Biol 109: 3105–14, 1989

Feige JJ, Baird A.
Detection of bFGF phosphorylation. Phosphorylated forms of bFGF.
In: "Methods in Enzymology", 146: 15 p, 1991

Feige JJ, Ling N, Baird A.
Phosphorylation of basic fibroblast growth factor by purified protein kinase C and the identification of a cryptic site of phosphorylation.
Biochem Biophys Res Commun 175(1): 31–6, 1991

Ferrara N.
Vascular endothelial growth factor.
TCM 3(6): 244–50, 1993

Fett JW, Strydom DJ, Lobb RR, Alderman EM, Bethune L, Riordan JF, Vallee BL.
Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells.
Biochem 24: 5480–6, 1985

Fett JW, Bethune JL, Vallee BL.

Induction of angiogenesis by mixtures of two angiogenic proteins, angiogenin and acidic fibroblast growth factor, in the chick chorioallantoic membrane.

Biochem Biophys Res Comm 146(3): 1122–31, 1987

Fischlein T, Zilla P, Meinhart J, Puschmann R, Vesely M, Eberl T, Balon R, Deutsch M.

In vitro endothelialization of a mesosystemic shunt: A clinical case report.

J Vasc Surg 19(3): 549–54, 1994

Fisher AC, How TV, de Cossart L, Annis D.

The longer term patency of a small diameter arterial prosthesis: The effect of the withdrawing of aspirin and dipyridamole therapy: The effect of reduced compliance.

Trans Am Soc Artif Intern Organs 31: 324–8, 1985

Folkman J, Ausprunk D, Langer R.

Connective tissue: Small blood vessels and capillaries.

In: "Textbook of Rheumatology", (Hrsg.: Kelley, Harris, Roddy, Sledge), Saunders Inc., Philadelphia, Vol. I: 210–20, 1981

Folkman J, Klagsbrun M.

Angiogenic factors.

Science 235: 442–7, 1987

Folkman J, Shing Y.

Angiogenesis (Minireview).

J Biol Chem 267(16): 10931–4, 1992

Follesa P, Wrathall JR, Mocchetti I.

Increased basic fibroblast growth factor mRNA following contusive spinal cord injury.

Brain Res Mol Brain Res 22(1–4): 1–8, 1994

Fox EA, Riordan JF.

Molecular biology of angiogenin.

In: "Molecular biology of the cardiovascular system", (Hrsg.: Chien S), Lea & Febiger Inc.: 139–54, 1990

Furcht LT.

Critical factors controlling angiogenesis: Cell products, cell matrix, and growth factors.

Lab Invest 55(5): 505–9, 1986

Garfin DE.

One-dimensional gel electrophoresis.

In: "Guide to protein purification", (Hrsg.: Deutscher MP), Academic Press Inc.

Methods in Enzymology 182: 425–41, 1990

Gertler JP, Abbott WM.

Prothrombotic and fibrinolytic function of normal and perturbed endothelium.

J Surg Res 52: 89–95, 1992

Gewirtz H.

The coronary circulation: Limitations of current concepts of metabolic control.

NIPS 6: 265–8, 1991

Ghabriel MN, Lawrenson JG, Reid AR, Allt G.

Endothelial anionic surface charge: The effect of its neutralization on the blood-nerve barrier.

Endothelium 2(3): 239–48, 1994

Glaser BM, Kalebic T, Garbisa S, Connor TB, Liotta L.

Degradation of basement membrane components by vascular endothelial cells: Role in neovascularization.

In: "Development of the Vascular System". Pitman London, Ciba Foundation Symposium 100: 150–62, 1983

Gospodarowicz D, Moran J, Braun D, Birdwell C.

Clonal growth of bovine vascular endothelial cells: Fibroblast growth factor as a survival agent.

Proc Natl Acad Sci USA 73(11): 4120–4, 1976

Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigerer L.

Molecular and biological characterization of fibroblast growth factor, an angiogenic factor which also controls the proliferation and differentiation of mesoderm and neuroectoderm derived cells.

Cell Diff 19: 1–17, 1986

Goto F, Goto K, Weindel K, Folkman J.

Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels.

Lab Invest 69(5): 491–3, 508–17, 1993

Graham LM, Burkel WE, Ford JW, Vinter DW, Kahn RH, Stanley JC.

Expanded polytetrafluoroethylene vascular prostheses seeded with enzymatically derived and cultured canine endothelial cells.

Surgery 91(5): 550–9, 1982

Green DR, Banuls MP, Gearing AJ, Needham LA, White MR, Clements JM.

Generation of human umbilical vein endothelial cell lines which maintain their differentiated phenotype.

Endothelium 2(2): 191–201, 1994

Hämmerle H, Betz E, Herr D.

Human endothelial cells are stimulated and vascular smooth muscle cells are inhibited in their proliferation and migration by heparins.

Vasa 20(3): 207–15, 1991

Hallahan TW, Shapiro R, Vallee BL.

Dual site model for the organogenic activity of angiogenin.

Proc Natl Acad Sci USA 88: 2222–6, 1991

Haller, H.

Calcium und Proteinkinase C als second messenger.

Z Gastroenterol Verh 26: 310–2, 1991

Harper JW, Vallee BL.

Conformational characterization of human angiogenin by limited proteolysis.

J Prot Chem 7(4): 355–63, 1988

Harper JW, Vallee BL.

Mutagenesis of aspartic acid-116 enhances the ribonucleolytic activity and angiogenic potency of angiogenin

Proc Natl Acad Sci USA 85: 7139–43, 1988

Harper JW, Vallee BL.

A covalent angiogenin/ribonuclease hybrid with a fourth disulfide bond generated by regional mutagenesis.

Biochemistry 28(4): 1875–84, 1989

Harper JW, Fox EA, Shapiro R, Vallee BL.

Mutagenesis of residues flanking Lys-40 enhances the enzymatic activity and reduces the angiogenic potency of angiogenin.

Biochemistry 29(31): 7297–7302, 1990

Heath, WF, Moore F, Bicknell R, Vallee BL.

Modulation of mitogenic stimuli by angiogenin correlates with in vitro phosphatidylinositol bisphosphate synthesis.

Proc Natl Acad Sci USA 86: 2718–22, 1989

Houslay MD.

"Crosstalk": A pivotal role for protein kinase C in modulating relationships between signal transduction pathways.

Eur J Biochem 195: 9–27, 1991

Hu GF, Chang SI, Riordan JF, Vallee BL.

An angiogenin-binding protein from endothelial cells.

Proc Natl Acad Sci USA 88: 2227–31, 1991

Hu GF, Strydom DJ, Fett JW, Riordan JF, Vallee BL.
Actin is a binding protein for angiogenin.
Proc Natl Acad Sci USA 90: 1217–21, 1993

Huang, KP.
Role of protein kinase C in cellular regulation.
Biofactors 2(3): 171–8, 1990

Hudlicka O, Tyler KR.
The effect of long-term high-frequency stimulation on capillary density and fibre types in rabbit fast muscles.
J Physiol 353: 435–45, 1984

Hudlicka O, Tyler KR.
Angiogenesis. The growth of the vascular system.
Academic Press, London 1986: S. 1

Hunter WM, Greenwood FC.
Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity.
Nature 194: 495–6, 1962

Ignotz RA, Massagué J.
Transforming growth factor- β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix.
J Biol Chem 261(9): 4337–45, 1986

Ishiguro N, Yabe Y, Shimizu T, Iwata H, Miura T.
Basic fibroblast growth factor has a beneficial effect on the viability of random skin flaps in rats.
Ann Plast Surg 32(4): 356–60, 1994

Johnson PC.
Platelet-mediated thrombosis in microvascular surgery: New knowledge and strategies.
Plast Reconstruct Surg 86(2): 359–67, 1990

Johnson PC, Sheppeck RA, Hribar SR, Bentz ML, Janosky J, Dickson CS.
Inhibition of platelet retention on artificial microvascular grafts with monoclonal antibodies and a high-affinity peptide directed against platelet membrane glycoproteins.
Arteriosclerosis 11(3): 552–60, 1991

- Kaehler J, Zilla P, Fasol R, Deutsch M, Kadletz M.
Precoating substrate and surface configuration determine adherence and spreading of seeded endothelial cells on polytetrafluoroethylene grafts.
J Vasc Surg 9: 535–41, 1989
- Kent KC, Oshima A, Ikemoto T, Whittemore AD.
An in vitro model for human endothelial cell seeding of a small diameter vascular graft.
Trans Am Soc Artif Intern Organs 34(3): 578–80, 1988
- Kent KC, Shindo S, Ikemoto T, Whittemore AD.
Species variation and the success of endothelial cell seeding.
J Vasc Surg 9(2): 271–6, 1989
- Kikkawa U, Takai Y, Minakucchi R, Inohara S, Nishizuka Y.
Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase from rat brain.
J Biol Chem 257(22): 13341–8, 1982
- Kikkawa U, Kishimoto A, Nishizuka Y.
The protein kinase C family: Heterogeneity and its implications.
Annu Rev Biochem 58: 31–44, 1989
- Kikkawa U, Nishizuka Y.
Protein Kinase C.
In: "The Enzymes", Academic Press Inc., New York, Vol. 17(5): 167–89, 1986
- Klagsbrun M, Dluž S.
Smooth muscle cell and endothelial cell growth factors.
TCM 3(6): 213–217
- Kogel H, Vollmar JF, Cyba-Altunbay S, Mohr W, Frösch D, Amselgruber W.
New observations on the healing process in prosthetic substitution of large veins by microporous grafts – animal experiments.
Thor Cardiovasc Surgeon 37: 119–24, 1989
- Kole HK, Abdel-Ghany M, Racker E.
Specific dephosphorylation of phosphoproteins by protein-serine and -tyrosine kinases.
Proc Natl Acad Sci USA 85: 5849–53, 1988
- Krauss RS, Housey GM, Hsiao WL, Johnson MK, Rotenberg SA, Borner CM, Weinstein IB.
The role of protein kinase C in signal transduction and cellular transformation.
Prog Clin Biol Res 340D: 175–82, 1990

Kurachi K, Rybak SM, Fett JW, Shapiro R, Strydom DJ, Olson KA, Riordan JF, Davie EW, Vallee BL.

Expression of human angiogenin in cultured baby hamster kidney cells.

Biochemistry 27(17): 6557–6562, 1988

Laemmli UK.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature 227(259): 680–5, 1970

Lash JM, Bohlen HG.

Perivascular and tissue pO_2 in contracting rat spinotrapezius muscle.

Am J Physiol 252 (Heart Circ Physiol 21): H1192–H1202, 1987

Lefebvre F, Drouillet F, Savin de Larclause AM, Aprahamian M, Midy D, Bordenave L, Rabaud M.

Repair of experimental arteriotomy in rabbit aorta using a new resorbable elastin-fibrin biomaterial.

J Biomed Mat Res 23: 1423–32, 1989

Lei van der B, Bartels HL, Dijk F, Wildevuur ChRH.

The thrombogenic characteristics of small caliber polyurethane vascular prostheses after heparin bonding.

Trans Am Soc Artif Intern Organs 31: 107–10, 1985

Lelkes PI.

Conference report: Endothelial cell heterogeneity and organ specificity.

Endothelium 1(1): 69–70, 1993

Le Peuch Ch, Ballester R, Rosen OM.

Purified rat brain calcium- and phospholipid-dependent protein kinase phosphorylates ribosomal protein S6.

Proc Natl Acad Sci USA 80: 6858–62, 1983

Lewis MJ, Shah AM.

Endothelial modulation of myocardial contraction.

Endothelium 1(4): 237–43, 1994

Li VW, Folkert RD, Watanabe H, Yu C, Rupnick M, Barnes P, Scott RM, Black PM, Sallan SE, Folkman J.

Microvessel count and cerebrospinal fluid basic fibroblast growth factor in children with brain tumours.

Lancet 344(8915): 82–6, 1994

Lindner V, Reidy MA, Fingerle J.

Regrowth of arterial endothelium: Denudation with minimal trauma leads to complete cell regrowth.

Lab Invest 61: 556–63, 1989

Lindner V, Majack RA, Reidy MA.

Basic fibroblast growth factor stimulates endothelial regrowth and proliferation in denuded arteries.

J Clin Invest 85: 2004–8, 1990

Luscher TF.

Endothelium in the control of vascular tone and growth: Role of local mediators and mechanical forces.

Blood Press Suppl 1: 18–22, 1994

Maes P, Damart D, Rommens C, Montreuil I, Spik G, Tartar A.

The complete amino acid sequence of bovine milk angiogenin.

FEBS Letters 241: 41–5, 1988

Marchand, F.

Der Prozeß der Wundheilung.

Enke Verlag Stuttgart, 1929

Marx JL.

Angiogenesis research comes of age.

Science 237: 23–4, 1987

Maximov, A.

Experimentelle Untersuchungen über die entzündliche Neubildung von Bindegewebe.

Gustav Fischer Verlag Jena, 1902

McNeil PL.

Cell wounding and healing. The opening and closing of wounds in the cell membrane provides a route for the release of molecules that maintain and repair tissue.

American Scientist 79: 222–35, 1991

Méresse S, Dehouck MP, Delorme P, Bensaid M, Tauber JP, Delbart C, Fruchart JC, Cecchelli R.

Bovine brain endothelial cells express tight junctions and monoamine oxidase activity in long-term culture.

J Neurochemistry 53(5): 1363–71, 1989

Miyata T, Conte MS, Trudell LA, Mason D, Whittemore AD, Birinyi LK.

Delayed exposure to pulstile shear stress improves retention of human saphenous vein endothelial cells on seeded ePTFE grafts.

Surg Res 50: 485–93, 1991

Montesano R, Orci L, Vassalli P.

In vitro rapid organization of endothelial cells into capillary-like networks is promoted by collagen matrices.

J Cell Biol 97: 1648–52, 1983

Morel NM, White MK, Wang Q, Hechtman HB, Shepro D.

An inflammatory stimulus induces rapid changes in wheat germ agglutinin binding to cultured microvessel endothelial cells.

Endothelium 2(3): 255–64, 1994

Moroianu J, Fett JW, Riordan JF, Vallee BL.

Actin is a surface component of calf pulmonary artery endothelial cells in culture.

Proc Natl Acad Sci USA 90(9): 3815–9, 1993.

Morrow NG, Kraus WE, Moore JW, Williams RS, Swain JL.

Increased expression of fibroblast growth factors in a rabbit skeletal muscle model of exercise conditioning.

J Clin Invest 85: 1816–20, 1990

Myrhage R, Hudlicka O.

Capillary growth in chronically stimulated adult skeletal muscle as studied by intravital microscopy and histological methods in rabbits and rats.

Microvasc Res 16(1): 73–90, 1978

Neufeld G, Gospodarowicz D.

The identification and partial characterization of the fibroblast growth factor receptor of baby hamster kidney cells.

J Biol Chem 260(5): 13860–8, 1985

Northover AM, Northover BJ.

Platelet-activating factor-induced changes in large vein endothelial cells and in microvascular permeability: Effects of cytochalasin B and phalloidin.

Endothelium 2(1): 59–66, 1994

Olivetti G, Constanza L, Quaini F, Ricci R, Moccia G, Capasso JM, Anversa P.

Capillary growth in anemia-induced ventricular wall remodeling in the rat heart.

Circ Res 65(5): 1182–92, 1989

Palmer KA, Scheraga HA, Riordan JF, Vallee BL.

A preliminary three-dimensional structure of angiogenin.

Proc Natl Acad Sci USA 83: 1965–9, 1986

Papadimitriou E, Unsworth BR, Maragoudakis ME, Lelkes PI.

Time course and quantification of extracellular matrix maturation in the chick chorioallantoic membrane and in cultured endothelial cells.

Endothelium 1(3): 207–19, 1993

Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R.

Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro.

Biochem Biophys Res Commun 189: 824–31, 1992

Phillips GD, Knighton DR.

Angiogenic activity in damaged skeletal muscles.

Proc Soc Exp Biol Med 193(3): 197–224, 1990

Plate KH.

Angiogenese und Anti-Angiogenese.

Dtsch Ärztebl 90(45): C2006–10, 1993

Rakusan K, Flanagan MF, Geva T, Southern J, Van Praagh R.

Morphometry of human coronary capillaries during normal growth and the effect of age in left ventricular pressure-overload hypertrophy.

Circulation 86(1): 38–46, 1992

Reinecke P, Hort W.

Untersuchungen über das Wachstum der Koronararterienäste beim Menschen unter physiologischen Bedingungen.

Z Kardiol 81: 110–15, 1992

Rijhsinghani K, Greenblatt M, Shubik P.

Vascular abnormalities induced by benzo[a]pyrene: An in vivo study in the hamster cheek pouch.

J Natl Cancer Inst 41(1): 205–16, 1968

Roberts JM, Forrester JV.

Factors affecting the migration and growth of endothelial cells from microvessels of bovine retina.

Exp Eye Res 50(2): 165–72, 1990

Schaper W, Gorge G, Winkler B, Schaper J.

The collateral circulation of the heart.

Progress Cardiovasc Diseases 31(1): 57–77, 1988

Schneider A, Melmed RN, Schwalb H, Karck M, Vlodavsky I, Uretzky G.

An improved method for endothelial cell seeding on polytetrafluoroethylene small caliber vascular grafts.

J Vasc Surg 15(4): 649–56, 1992

Schnitzer JE.

Update on the cellular and molecular basis of capillary permeability.

TCM 3(4): 124–30, 1993

Shapiro R, Strydom DJ, Olson KA, Vallee BL.

Isolation of angiogenin from normal human plasma.

Biochem 26: 5141–6, 1987

Shapiro R, Harper JW, Fox EA, Jansen HW, Hein F, Uhlmann E.

Expression of Met-(–1) angiogenin in escherichia coli: Conversion to the authentic <Glu-1 protein.

Anal Biochem 175: 450–61, 1988

Shindo S, Tagaki A, Whittemore AD.

Improved patency of collagen-impregnated grafts after in vitro autogenous endothelial cell seeding.

J Vasc Surg 6(4): 325–32, 1987

Soncin F.

Angiogenin supports endothelial and fibroblast cell adhesion.

Proc Natl Acad Sci USA 89(6): 2232–6, 1992

Stronck JWS, van der Lei B, Wildevuur CRH.

Improved healing of small-caliber polytetrafluoroethylene vascular prostheses by increased hydrophilicity and by enlarged fibril length. An experimental study in rats.

J Thor Cardiovasc Surg 103(1): 146–52, 1992

Strydom DJ, Fett JW, Lobb RR, Alderman EM, Bethune JL, Riordan JF, Vallee BL.

Amino acid sequence of human tumor derived angiogenin.

Biochem 24: 5486–94, 1985

Sun D, Kaley G, Koller A.

Role of endothelium in function of isolated arterioles of rat mesentery and gracilis muscle.

Endothelium 1(2): 115–22, 1993

Sung CP, Arleth AJ, Ohlstein EH.

Involvement of protein kinase C in cytokine-induced tissue factor production in human vascular endothelial cells.

Endothelium 2(3): 209–16, 1994

Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM.

Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model.

J Clin Invest 93: 662–70, 1994

Thomas KA, Gimenez-Gallego G.

Fibroblast growth factors: Broad spectrum mitogens with potent angiogenic activity.

TIBS 11: 81–4, 1986

Thompson JA, Anderson KD, DiPietro JM, Zwiebel JA, Zametta M, Anderson WF, Maciag T. Site-directed neovessel formation in vivo.

Science 241: 1349–52, 1988

Thompson JA, Haudenschild CC, Anderson KD, DiPietro JM, Anderson WF, Maciag T.

Heparin-binding growth factor 1 induces the formation of organoid neovascular structures in vivo.

Proc Natl Acad Sci USA 86: 7928–32, 1989

Tomasi V, Manica F, Spisni E.

Polypeptide growth factors and angiogenesis.

BioFactors 2(4): 213–7, 1990

Trudell A, Boudreau L, Van De Water JM, Jauregui H, Richardson PD, Galletti PM.

Alcohol-treated PTFE vascular grafts.

Trans Am Artif Intern Organs 24: 320–3, 1978

Uchida T, Filburn ChR.

Affinity chromatography of protein kinase C – phorbol ester receptor on polyacrylamide-immobilized phosphatidylserine.

J Biol Chem 259(20): 12311–4, 1984

Uhl E, Barker JH, Bondar I, Galla TJ, Lehr HA, Messmer K.

Improvement of skin flap perfusion by subdermal injection of recombinant human basic fibroblast growth factor.

Ann Plast Surg 32(4): 361–6, 1994

Vallee BL, Riordan JF.

Chemical and biochemical properties of human angiogenin.

In: "Biology of growth factors", Keffrey, Kudlow et al. (Hrsg.), Plenum Publishing Corp., New York: 41–53, 1988

Veomett G, Kuszynski C, Kazakoff P, Rizzino A.

Cell density regulates the number of cell surface receptors for fibroblast growth factor.

Biochem Biophys Res Commun 159(2): 694–700, 1989

Walton GM, Bertics PJ, Hudson LG, Vedvick TS, Gill GN.

A three-step purification procedure for protein kinase C: Characterization of the purified enzyme.

Anal Biochem 161: 425–37, 1987

Weinstein IB.

The role of protein kinase C in growth control and the concept of carcinogenesis as a progressive disorder in signal transduction.

Adv Second Messenger Phosphoprotein Res 24: 307–16, 1990

Wiedeman MP.

Blood flow through terminal arterial vessels after denervation of the bat wing.

Circ Res 22: 83–9, 1968

Wise BC, Raynor RL, Kuo JF.

Phospholipid-sensitive Ca^{++} -dependent protein kinase from heart. I. Purification and general properties.

J Biol Chem 257(14): 8481–8, 1982

Wise BC, Glass DB, Jen Chou CH, Raynor RL, Katoh N, Schatzman RC, Turner RS, Kibler RF, Kuo JF.

Phospholipid-sensitive Ca^{++} -dependent protein kinase from heart. II. Substrate specificity and inhibition by various agents.

J Biol Chem 257(14): 8489–95, 1982

Woodgett JR, Hunter T.

Isolation and characterization of two distinct forms of protein kinase C.

J Biol Chem 262(10): 4836–43, 1987

Xiao Y, Bicknell R, Vallee BL.

Angiogenin depresses aortic smooth muscle cell cAMP by a pertussis toxin sensitive mechanism.

Biochem Biophys Res Commun 163(2): 902–7, 1989

Zhang J, Cousens LS, Barr PJ, Sprang SR.

Three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor, a structural homolog of interleukin 1 β .

Proc Natl Acad Sci USA 88: 3446–50, 1991

Zilla P, Fasol R, Preiss P, Kadletz M, Deutsch M, Schima H, Tsangaris S, Groscurth P.

Use of fibrin glue as a substrate for in vitro endothelialization of PTFE vascular grafts.

Surgery 105(4): 515–22, 1989

Zilla P, Fasol R, Grimm M, Fischlein T, Eberl T, Preiss P, Krupicka O, von Oppell U, Deutsch M.

Growth properties of cultured human endothelial cells on differently coated artificial heart materials.

J Thorac Cardiovasc Surg 101: 671–80, 1991

Zilla P, von Oppell U, Deutsch M.

The Endothelium: A key to the future.

J Card Surg 8: 32–60, 1993

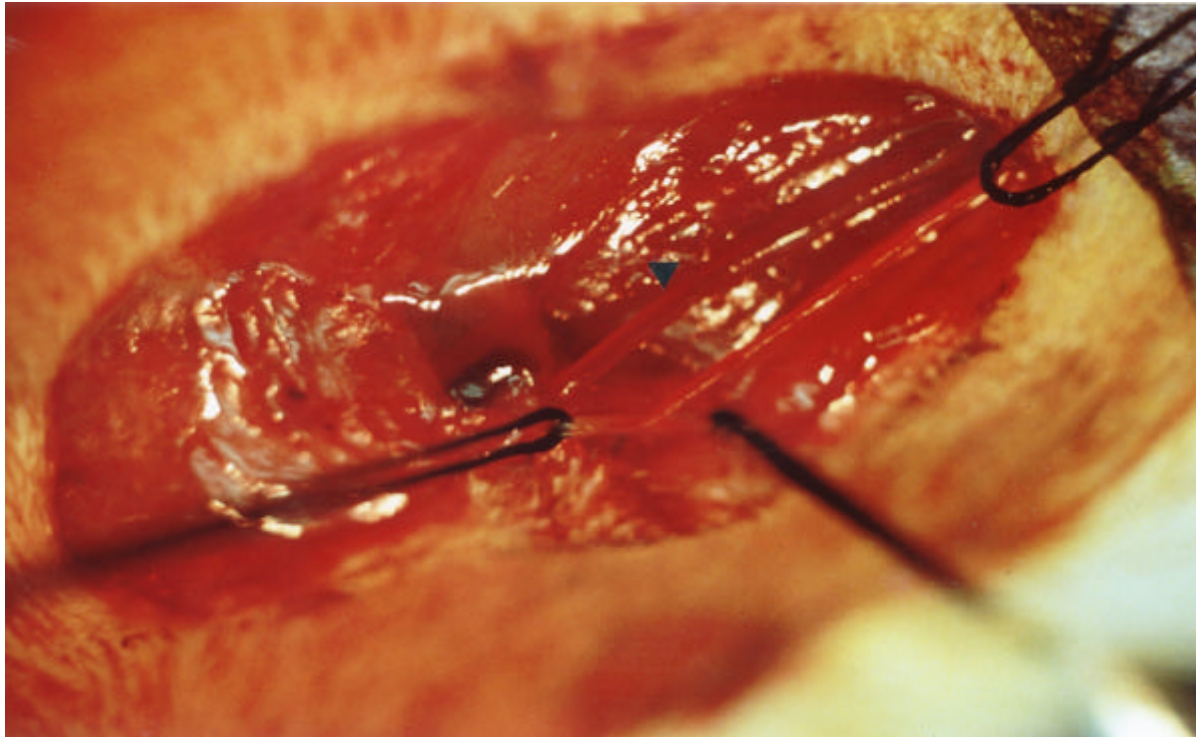
Zilla P, Deutsch M, Meinhart J, Puschmann R, Eberl T, Minar E, Dudczak R, Lugmaier H, Schmidt P, Noszian I, Fischlein T.

Clinical in vitro endothelialization of femoropopliteal bypass grafts: An actuarial follow-up over three years.

J Vasc Surg 19(3): 540–8, 1994

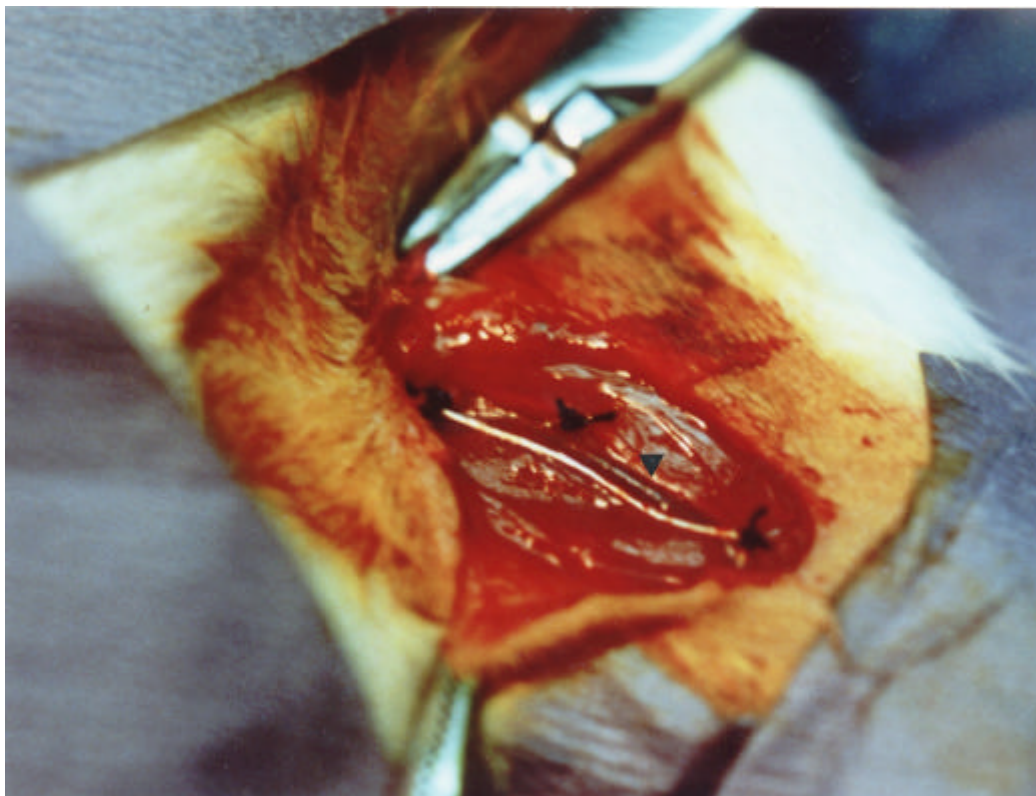
9. ANHANG 1:

Verzeichnis der Abbildungen

**ABB. 1:**

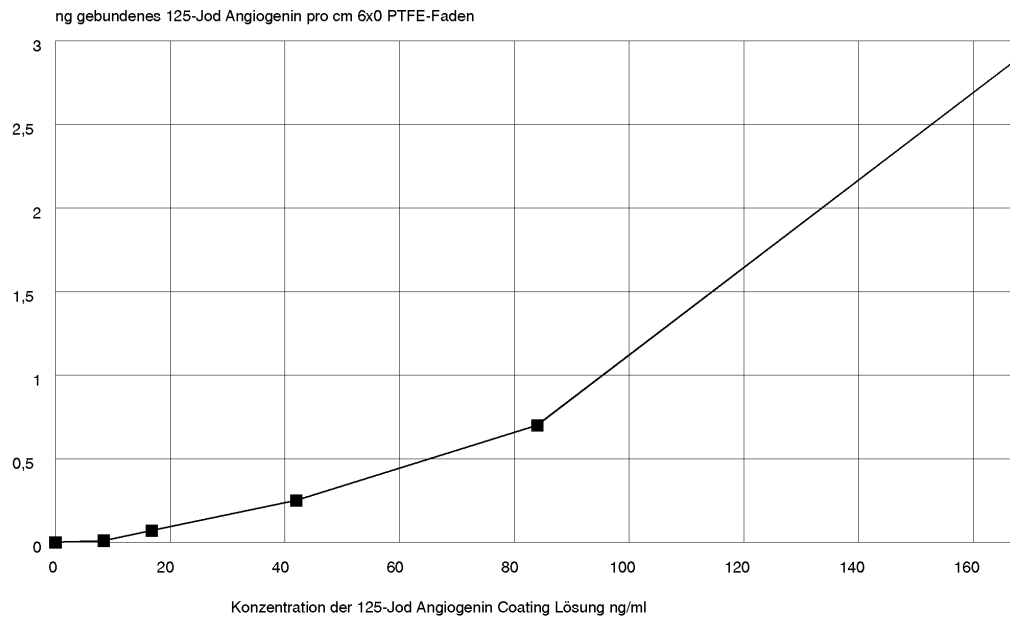
OP-Situs der eröffneten Leistenbeuge der Ratte. Mit schwarzen 4x0 Seidenfäden sind die A. femoralis communis, superficialis und die A. profunda femoris angeschlungen.

▽ - Vena femoralis. Bildorientierung: links - proximal, rechts - distal. Vergrößerung: 8-fach.

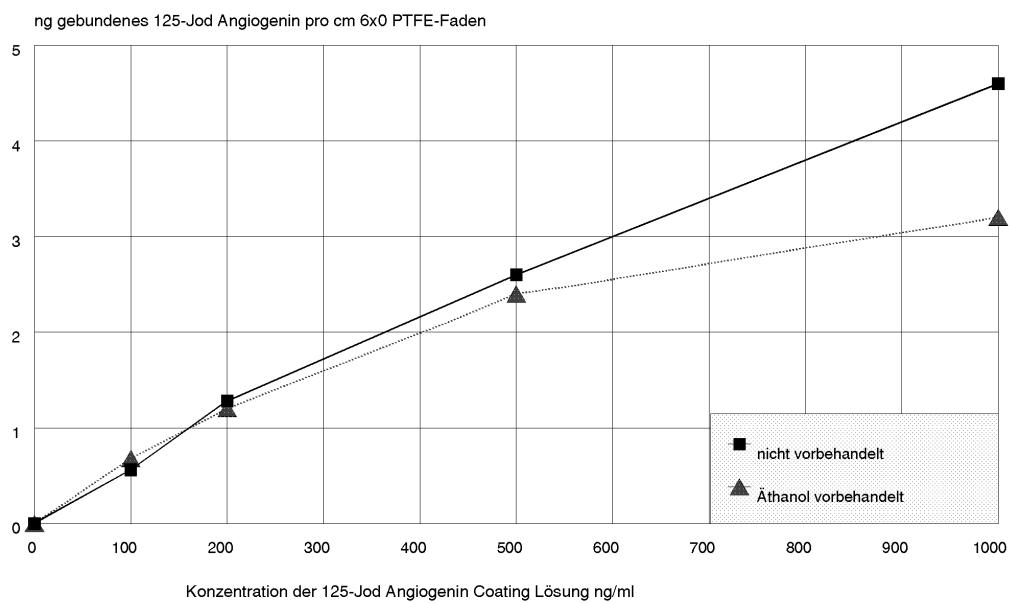
**ABB. 2:**

OP-Situs der eröffneten Leistenbeuge der Ratte nach Resektion der Femoralisbifurkation auf 1 cm Länge unter Interposition eines 6x0 ePTFE-Fadens (weiß). Mit schwarzen 4x0 Seidenfäden sind die Gefäßstümpfe der A. femoralis communis, superficialis und der A. profunda femoris ligiert.

▽ - Vena femoralis. Bildorientierung: links - proximal, rechts - distal. Vergrößerung: 5-fach



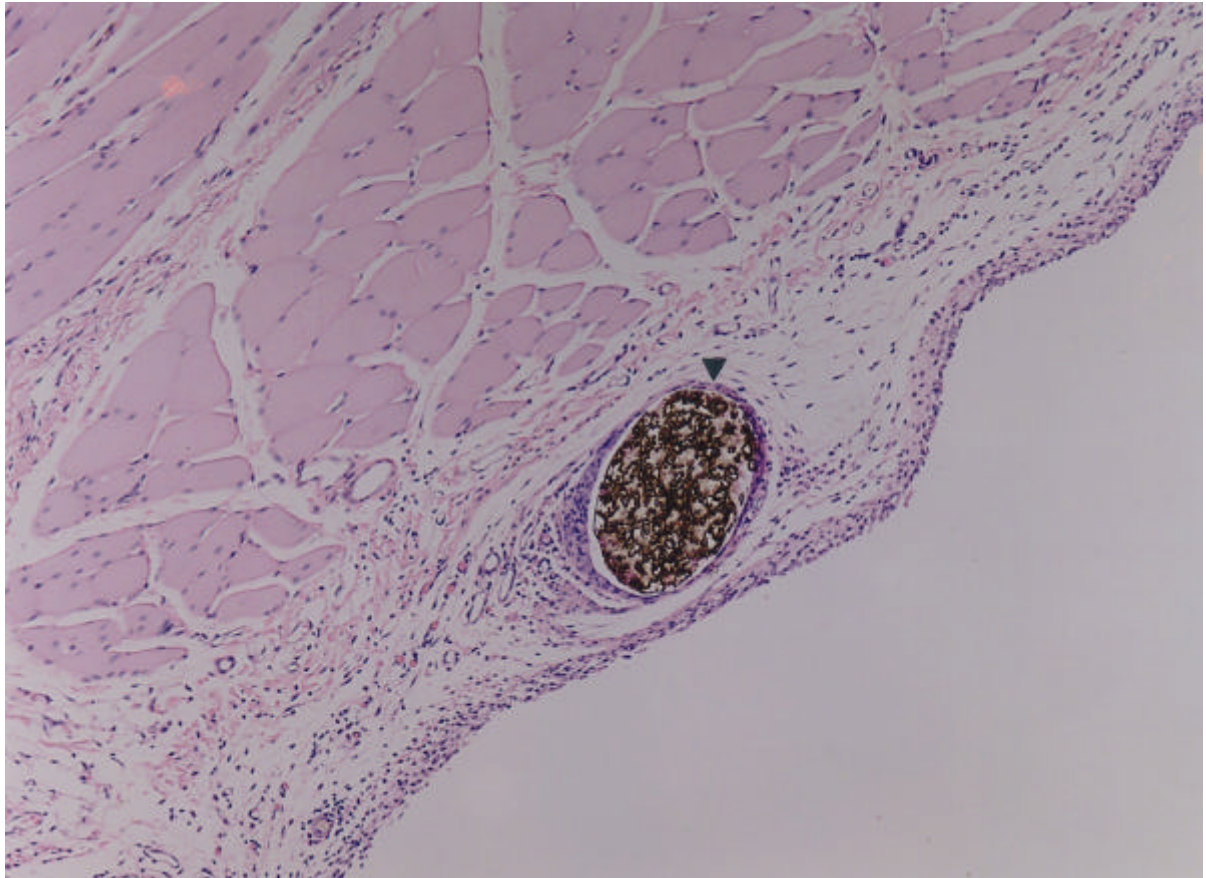
A



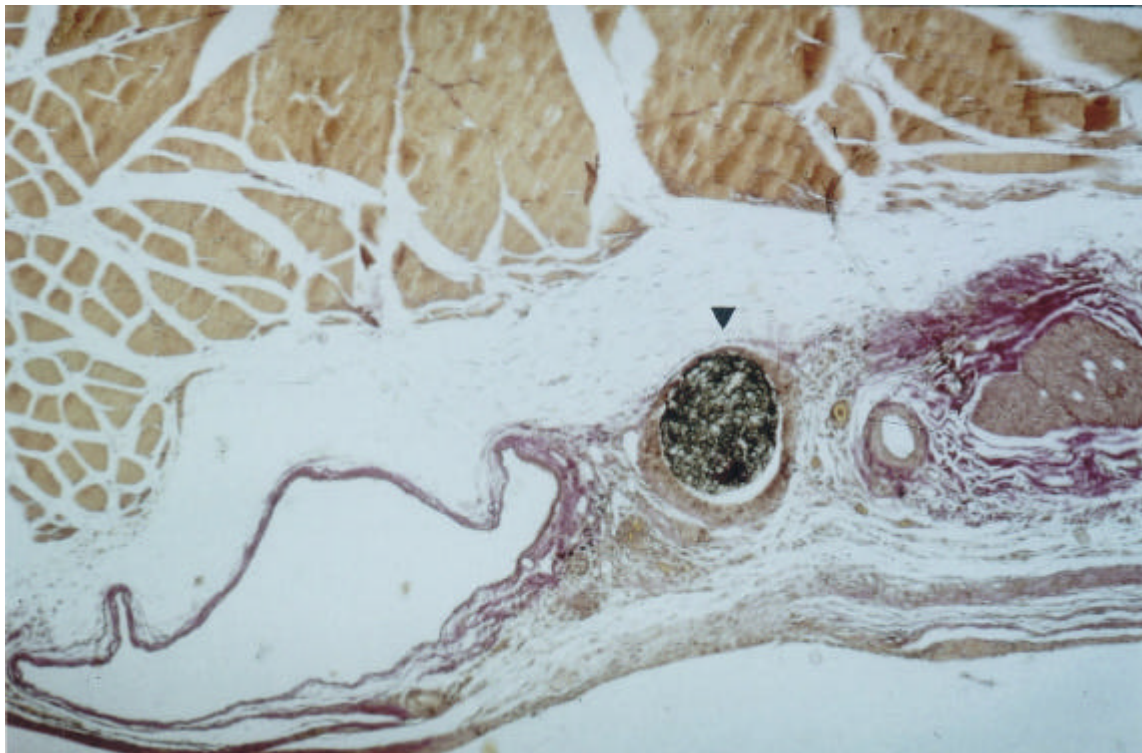
B

ABB. 3:

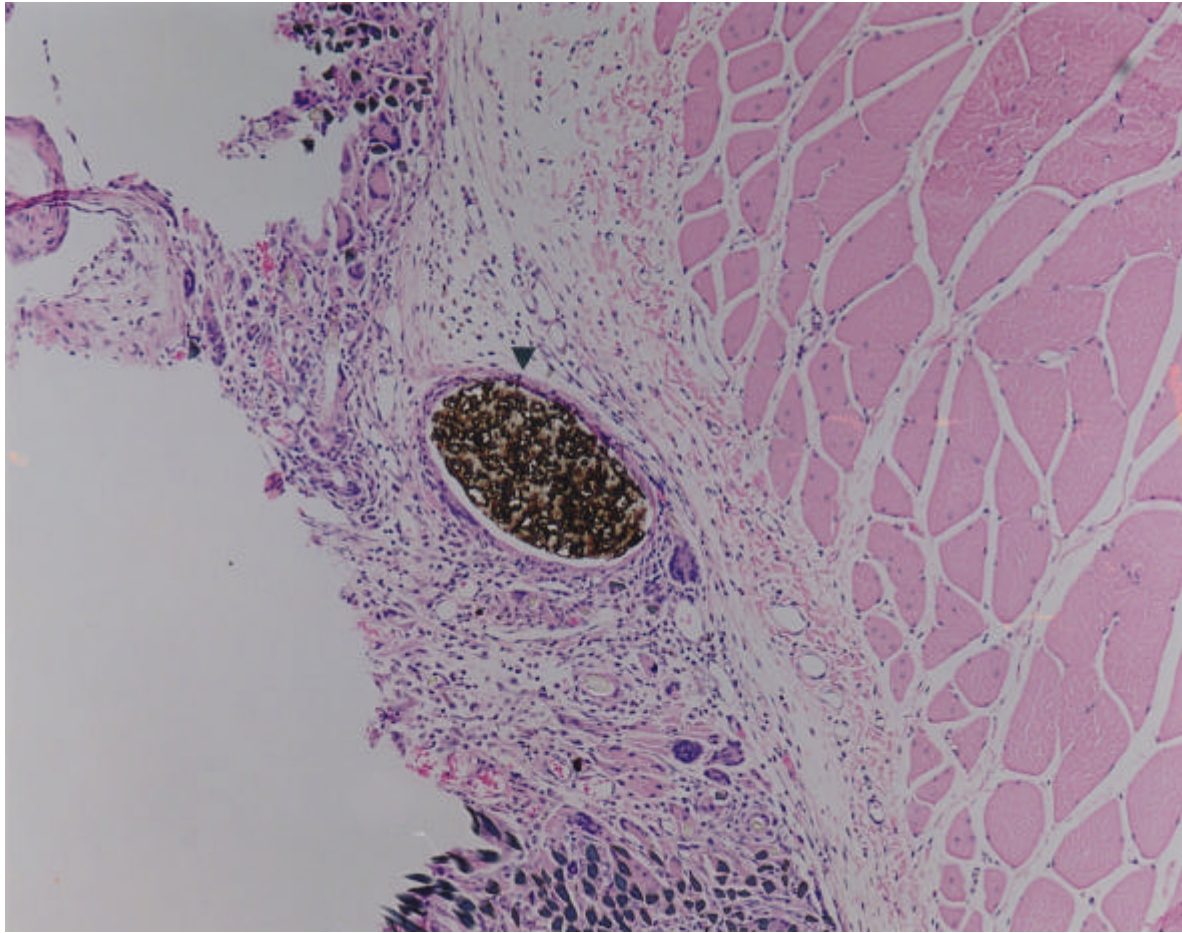
Adsorption von 125 -Jod markiertem Angiogenin an Collagen I beschichtete 6x0 ePTFE-Fäden. **A** – Bestimmung nach der Chloramin-T-Radiojod-Methode. **B** – Bestimmung mit der Enzymobead^R-Reaktion.

**ABB. 4 A:**

Histologisches Präparat aus der Kontrollgruppe 7 Tage nach Ischämieerzeugung. Unbehandelter 6x0 ePTFE-Faden im Bildzentrum orthograd geschnitten ↓. Färbung: Hämatoxylin-Eosin. Vergrößerung: 80x.

**ABB. 4 B:**

Histologisches Präparat aus der Collagengruppe 07 Tage nach Ischämieerzeugung. Mit Collagen I beschichteter 6x0 ePTFE-Faden im Bildzentrum orthograd geschnitten ↓. Färbung: Resorchin-fuchsin- van Gieson. Vergrößerung: 40x.

**ABB. 4 C:**

Histologisches Präparat aus der Angiogeningruppe 07 Tage nach Ischämieerzeugung. Mit Collagen I und 1,9 ng Angiogenin beschichteter 6x0 ePTFE-Faden im Bildzentrum orthograd geschnitten ↓. Färbung: Hämatoxylin-Eosin. Vergrößerung: 80x.

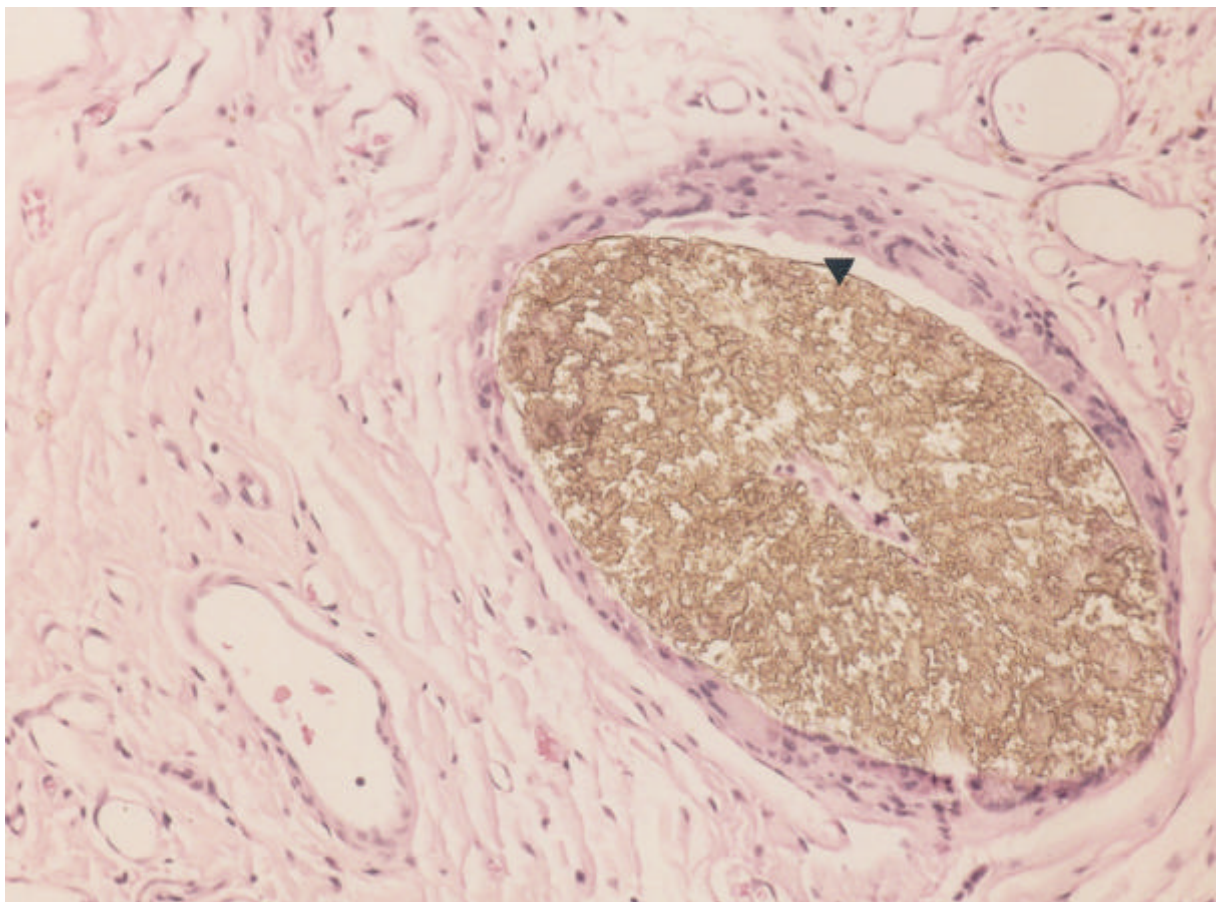
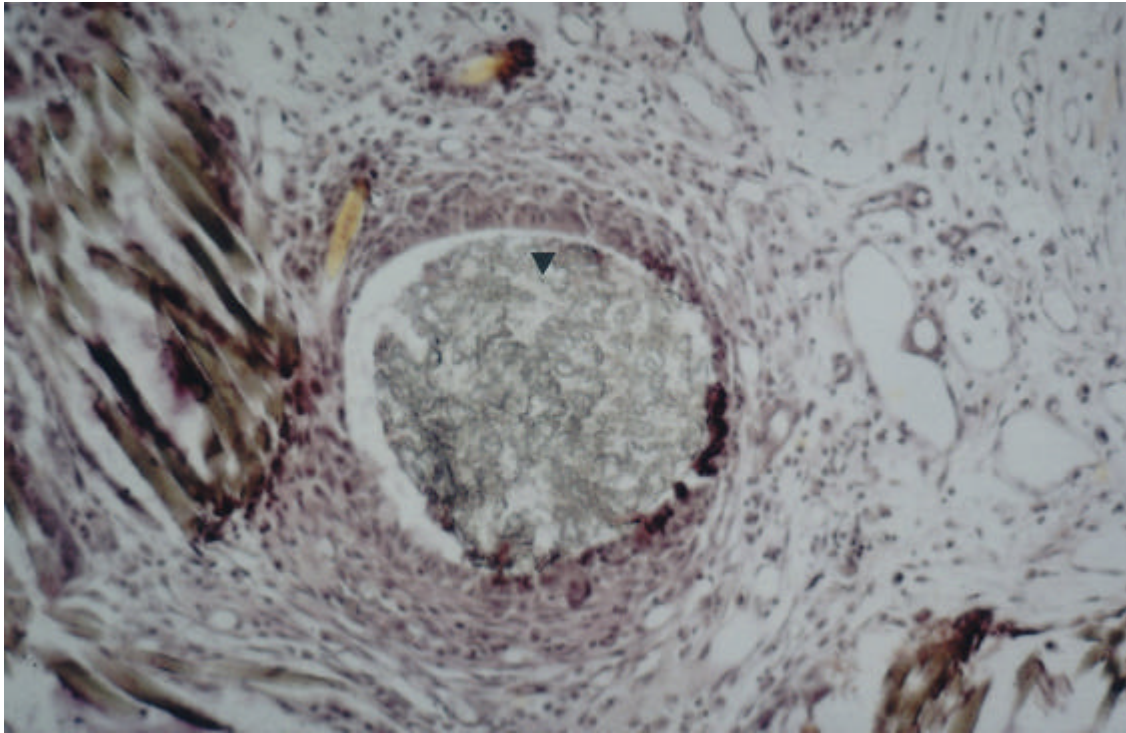


ABB. 5: Histologisches Präparat aus der Angiogeningruppe 07 Tage nach Ischämieerzeugung. Mit Collagen I und 1,9 ng Angiogenin beschichteter 6x0 ePTFE-Faden im Bild angeschnitten ↓. Oben: Färbung Resorcin-fuchsin-van Gieson. Unten: Färbung Hämatoxylin-Eosin. Vergrößerung: 100x.

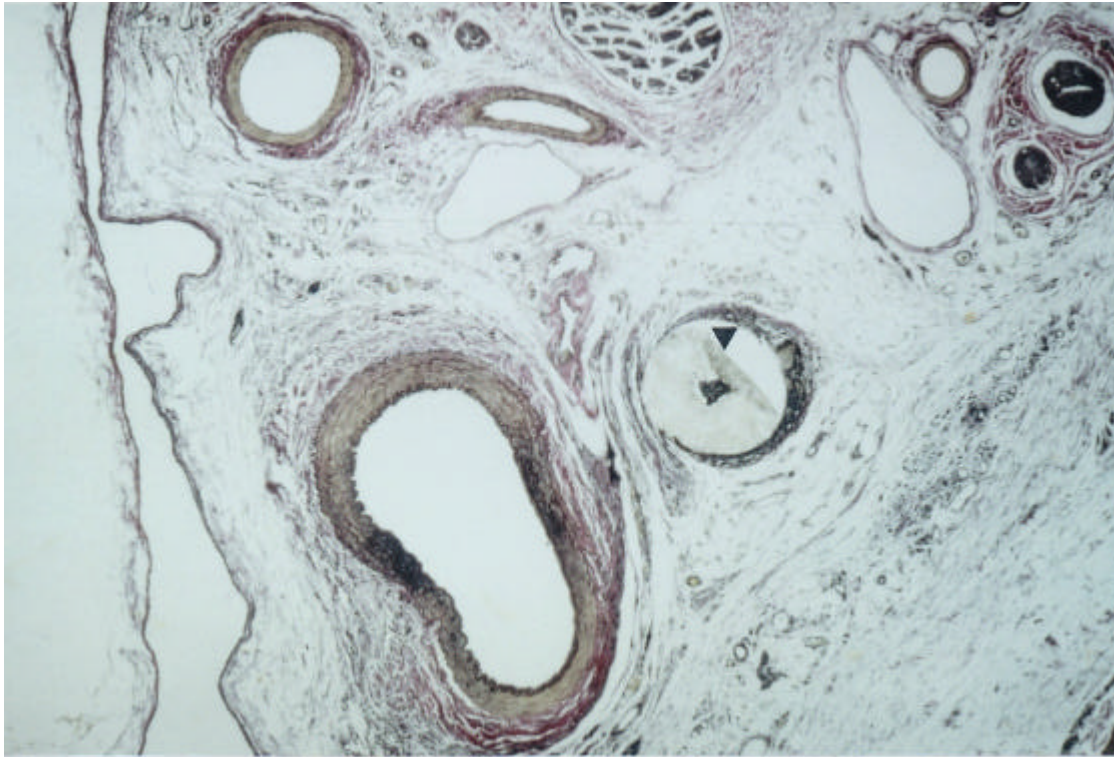


ABB. 6 A: Histologisches Präparat aus der Kontrollgruppe 14 Tage nach Ischämieerzeugung. Unbehandelter 6x0 ePTFE-Faden im Bildzentrum orthograd geschnitten ↓. Färbung: Resorcinfuchsin- van Gieson. Vergrößerung: 40x.

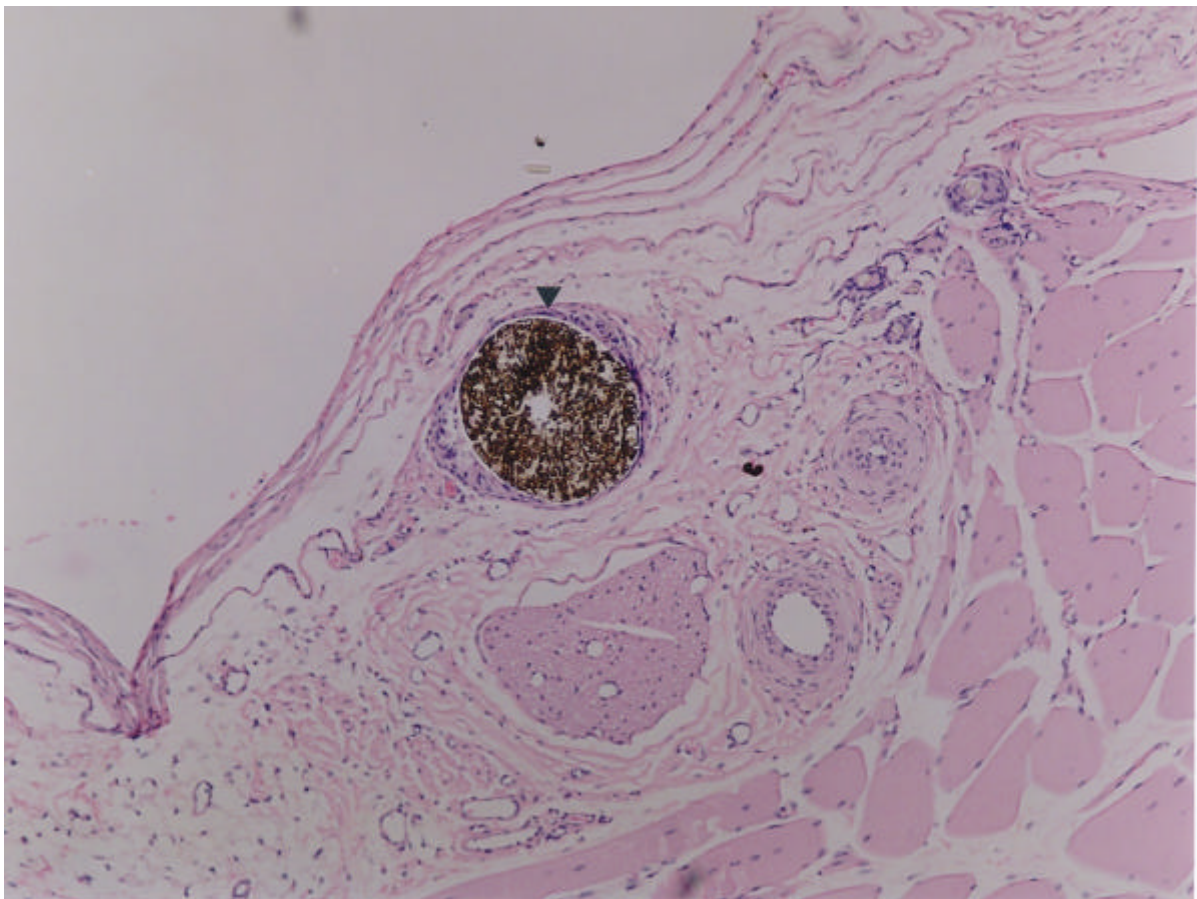
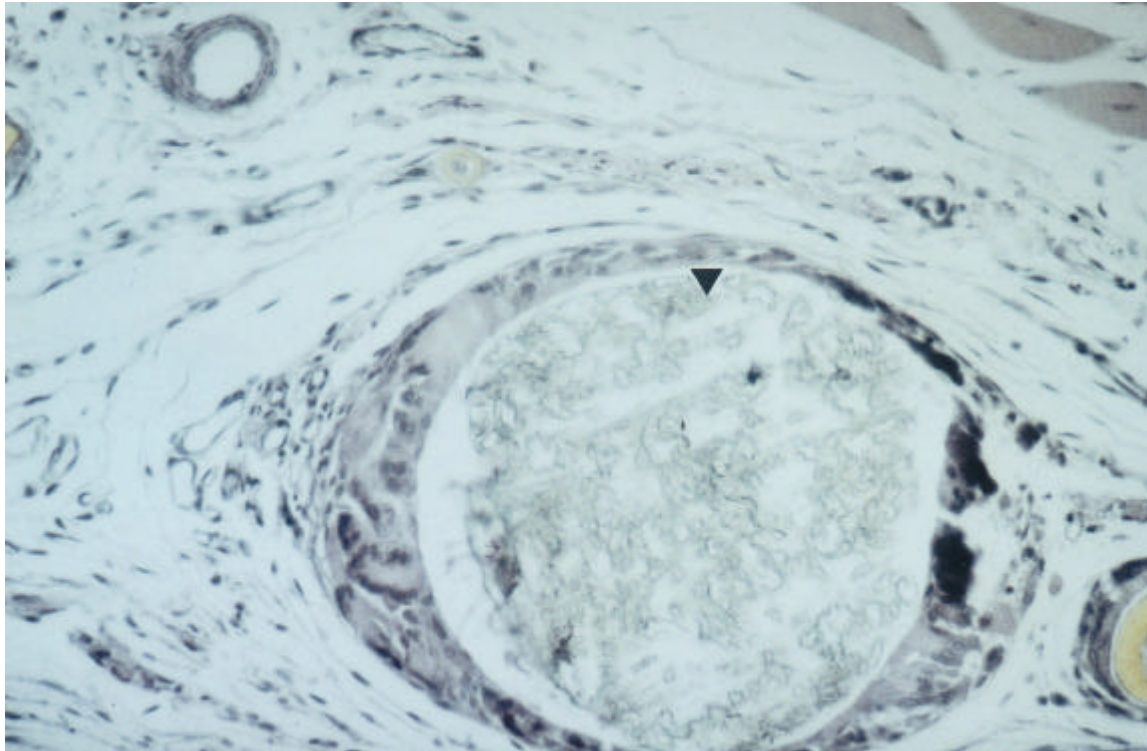
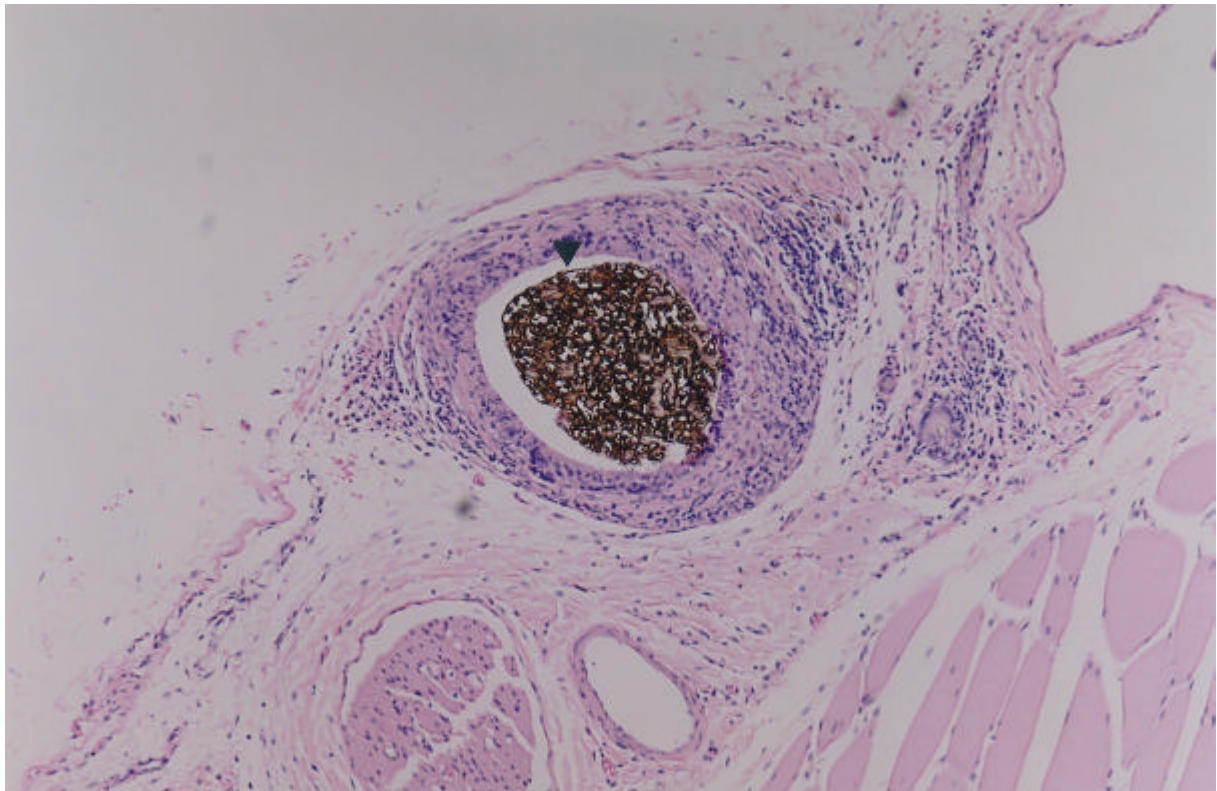
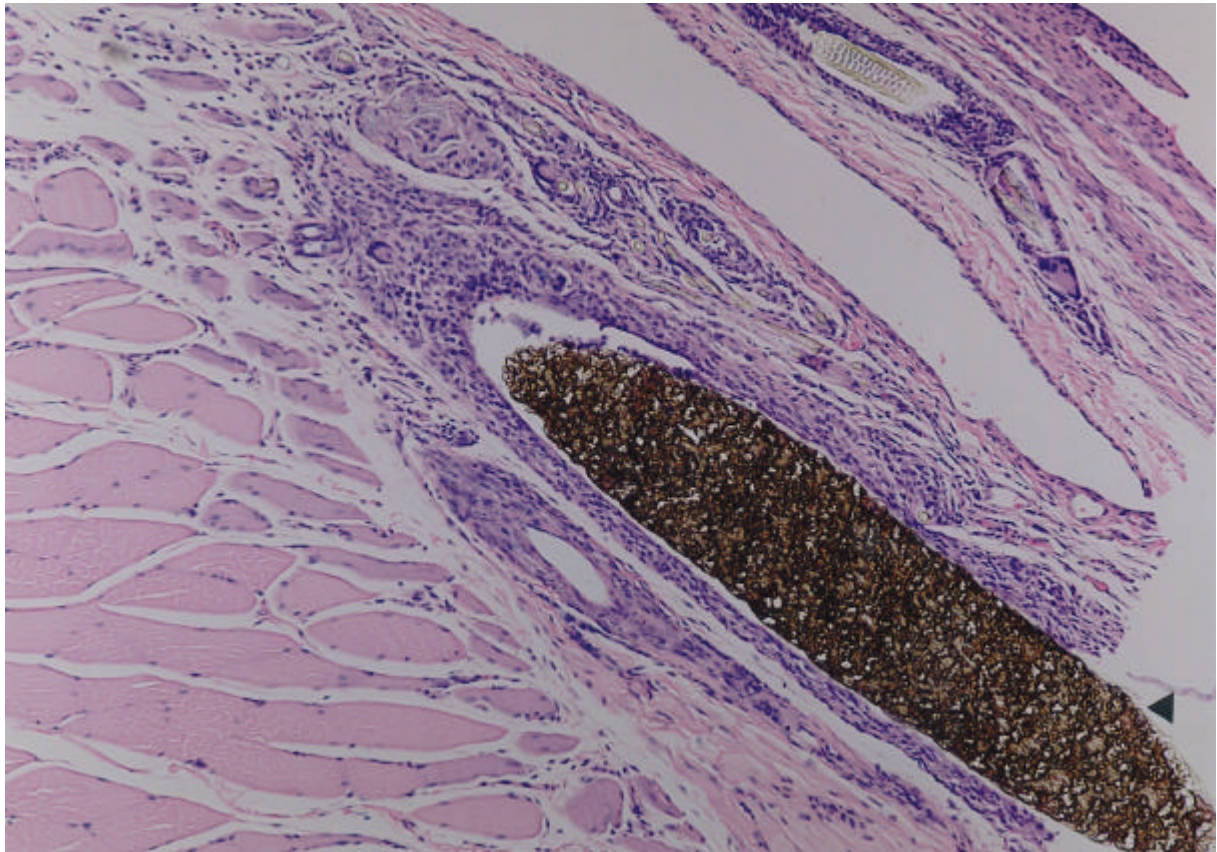


ABB. 6 B: Histologisches Präparat aus der Collagengruppe 14 Tage nach Ischämieerzeugung. Mit Collagen I beschichteter 6x0 ePTFE-Faden im Bildzentrum orthograd geschnitten ↓. Färbung: Hämatoxylin-Eosin. Vergrößerung : 100x.

**ABB. 6 C:**

Histologisches Präparat aus der Angiogeningruppe 14 Tage nach Ischämieerzeugung. Mit Collagen I und 1,9 ng Angiogenin beschichteter 6x0 ePTFE-Faden im Bildzentrum orthograd geschnitten ↓. Färbung: Resorcin-fuchsin- van Gieson. Vergrößerung: 100x.

**ABB. 7:**

Histologisches Präparat aus der Angiogeningruppe 42 Tage nach Ischämieerzeugung. Mit Collagen I und 1,9 ng Angiogenin beschichteter 6x0 ePTFE-Faden im Bildzentrum im oberen Bild längs \leftarrow und im unteren Bild orthograd \downarrow geschnitten. Färbung: Hämatoxylin-Eosin. Vergrößerung: 80x.

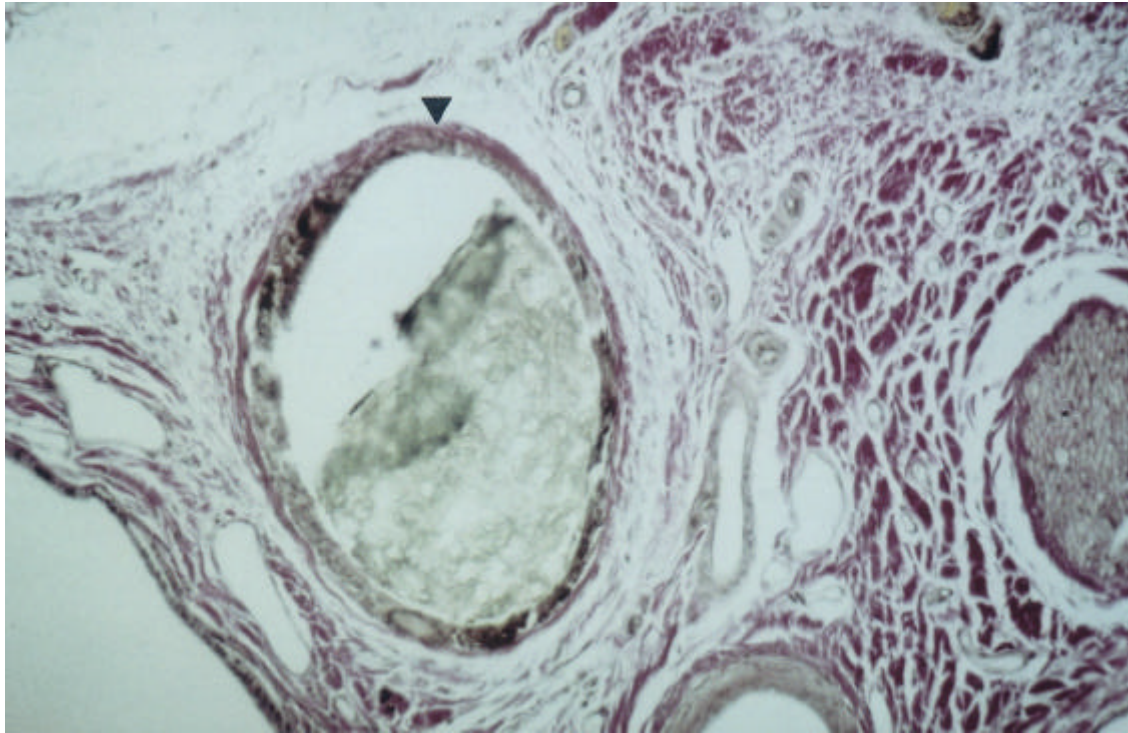


ABB. 8:
Histologisches Präparat aus der Kontrollgruppe 70 Tage nach Ischämieerzeugung. Unbehandelter 6x0 ePTFE-Faden im Bildzentrum orthograd geschnitten ↓. Färbung: Resorcinfuchsin- van Gieson. Vergrößerung 100x.

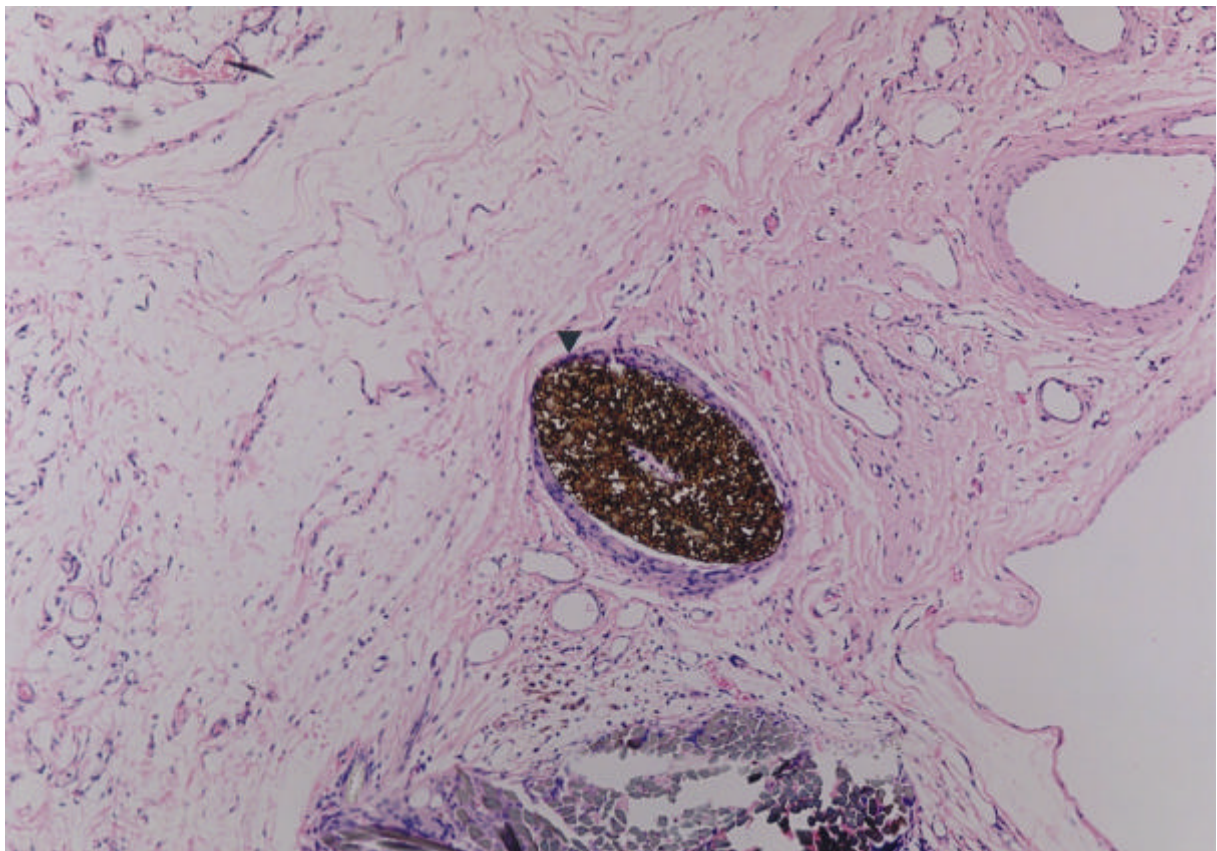


ABB. 9:
Histologisches Präparat aus der Collagengruppe 70 Tage nach Ischämieerzeugung. Mit Collagen I beschichteter 6x0 ePTFE-Faden im Bildzentrum orthograd geschnitten ↓. Färbung: Hämatoxylin-Eosin. Vergrößerung: 80x.

Gefäßanzahl in den ischämischen Rattenhinterläufen

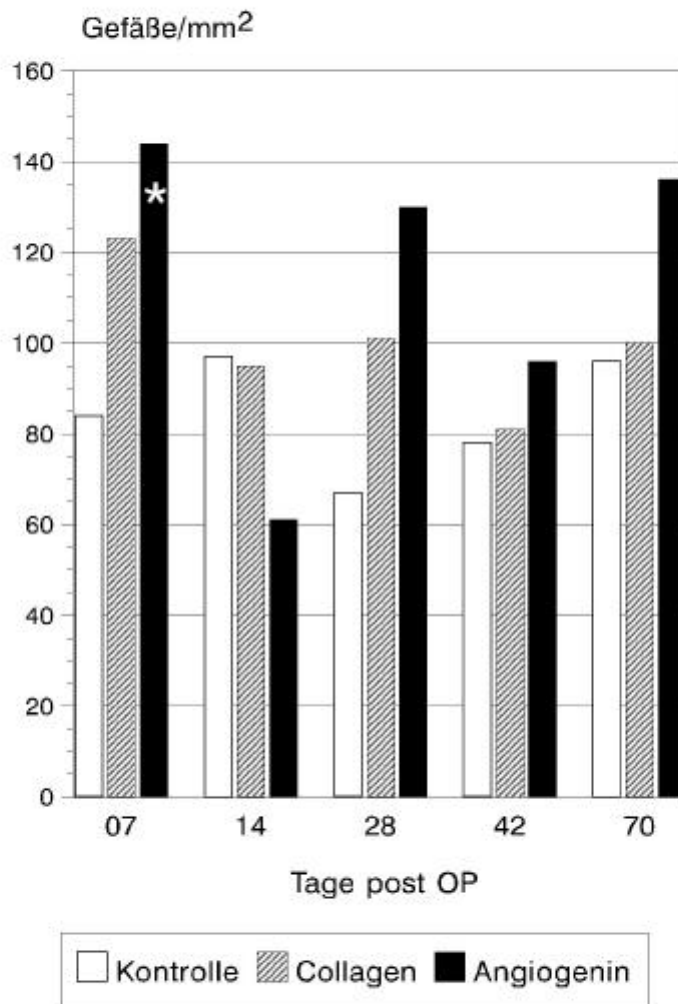
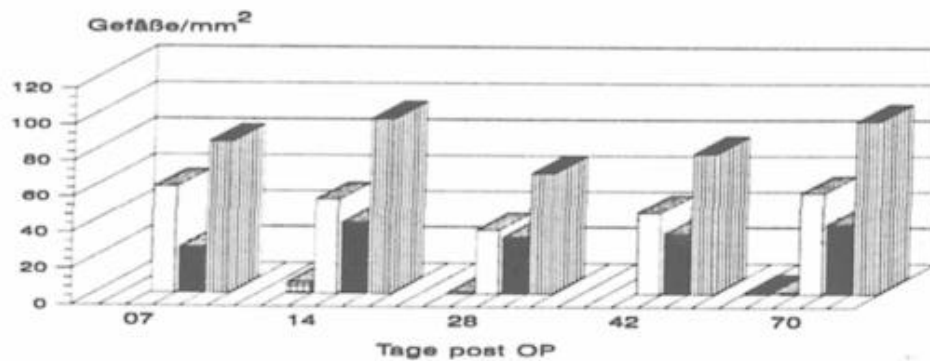


ABB. 10:

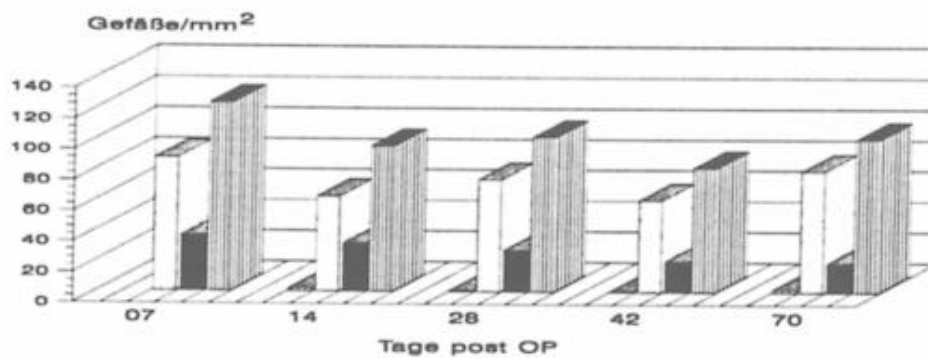
Vergleich der Gesamtgefäßzahl pro mm² der Kontrollgruppen, der Collagengruppen und der Angiogeningruppen 07 - 70 Tage nach Erzeugung der Ischämie.

* - signifikant ($p \leq 0,05$) nach Scheffe'-Test gegenüber allen Kontrollgruppen, den Collagengruppen und den Angiogeningruppen 14 und 42 Tage nach Erzeugung der Ischämie.

Verteilung der Gefäße in der Kontrollgruppe



Verteilung der Gefäße in der Collagengruppe



Verteilung der Gefäße in der Angiogeningruppe

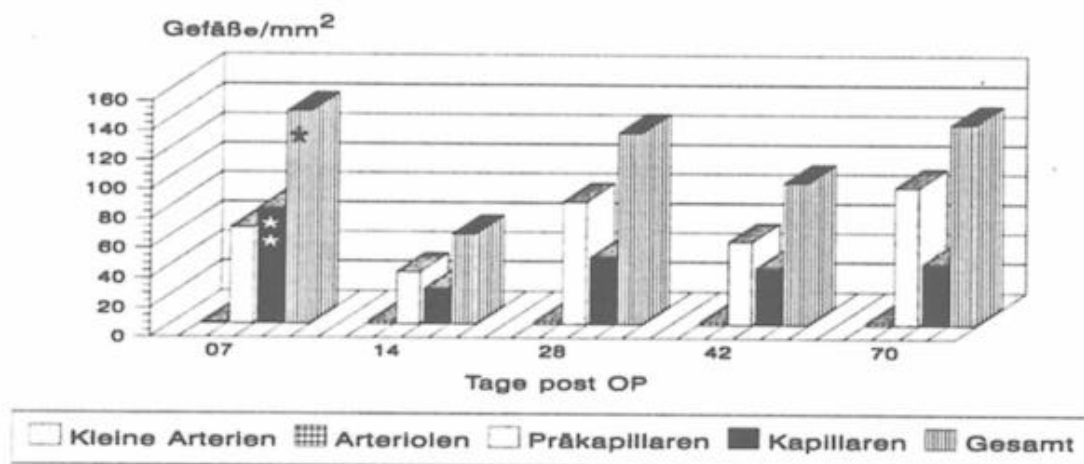


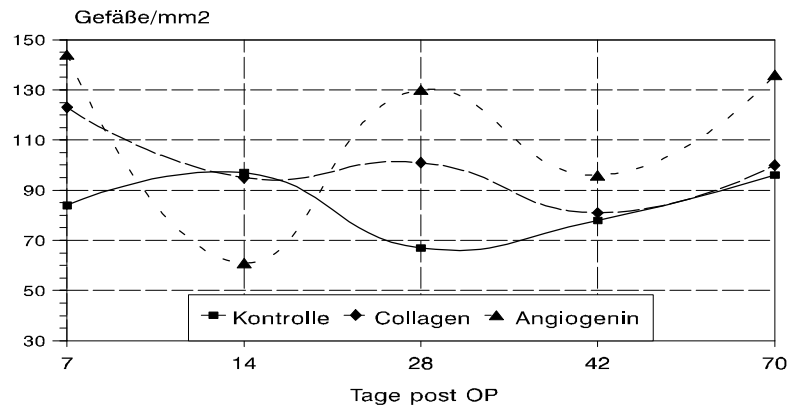
ABB. 11:

Darstellung der in den einzelnen Gruppen ausgewählten Kapillaren, Präkapillaren, Arteriolen und kleinen Arterien pro mm² nach den Kriterien aus TABELLE 2. Kontrollgruppe – unbeschichteter PTFE-Faden, Collagengruppe – Collagen I beschichteter PTFE-Faden, Angiogeningruppe – Collagen I und 1,9 ng Angiogenin beschichteter PTFE-Faden.

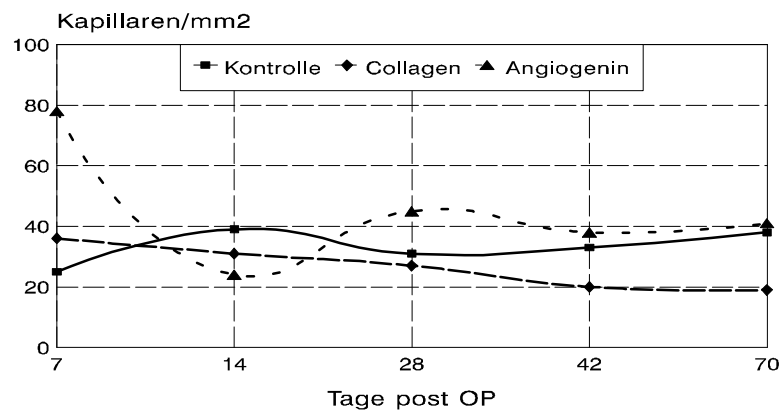
* - Gesamtgefäßzahl signifikant höher ($p \leq 0,05$) nach Scheffe'-Test gegenüber allen Kontrollgruppen, den Collagengruppen und den Angiogeningruppen 14 und 42 Tage nach Erzeugung der Ischämie.

** - Kapillaren/mm² nach dem Scheffe'-Test signifikant höher ($p \leq 0,05$) im Vergleich zu der Kapillardichte in allen anderen Gruppen.

Gefäße/mm2 im Gruppenvergleich



Kapillaren/mm2 im Gruppenvergleich



Präkapillaren/mm2 im Gruppenvergleich

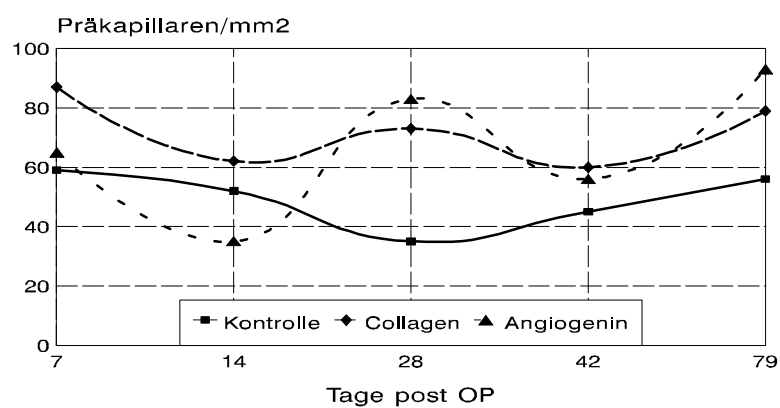
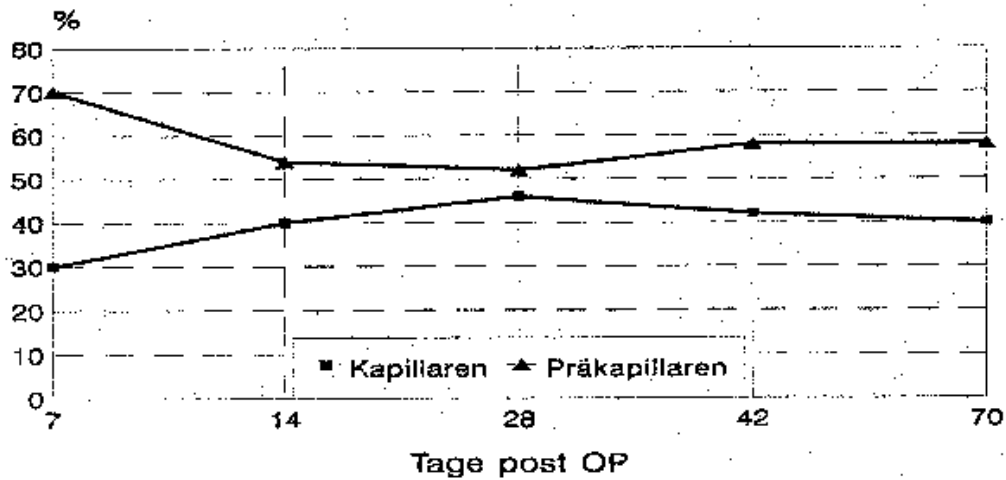


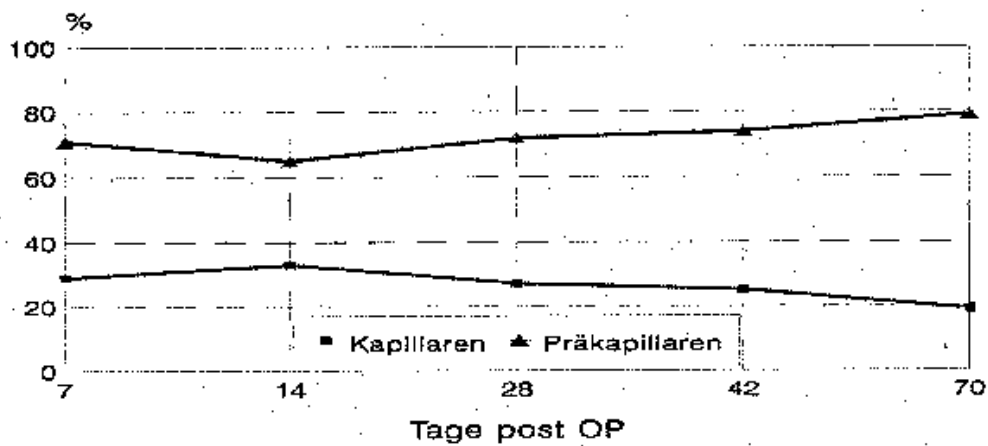
ABB. 12:

Kinetik der Angiogenese 7–70 Tage nach Ischämieinduktion in den Rattenhinterläufen als amplituden- und phasenmodulierte gedämpfte Sinusschwingung. Kontrolle – unbeschichteter PTFE-Faden, Collagen – Collagen I beschichteter PTFE-Faden, Angiogenin – Collagen I und 1,9 ng Angiogenin beschichteter PTFE-Faden.

Kontrollgruppe



Collagengruppe



Angiogeningruppe

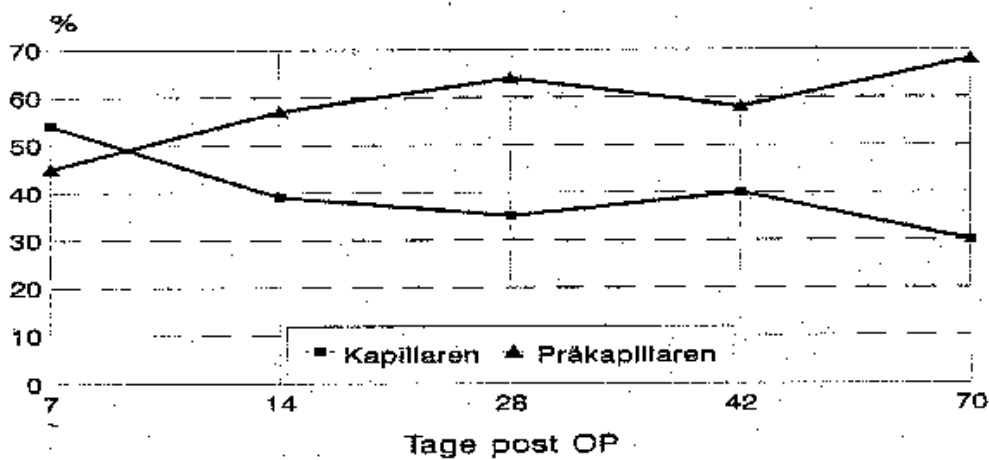
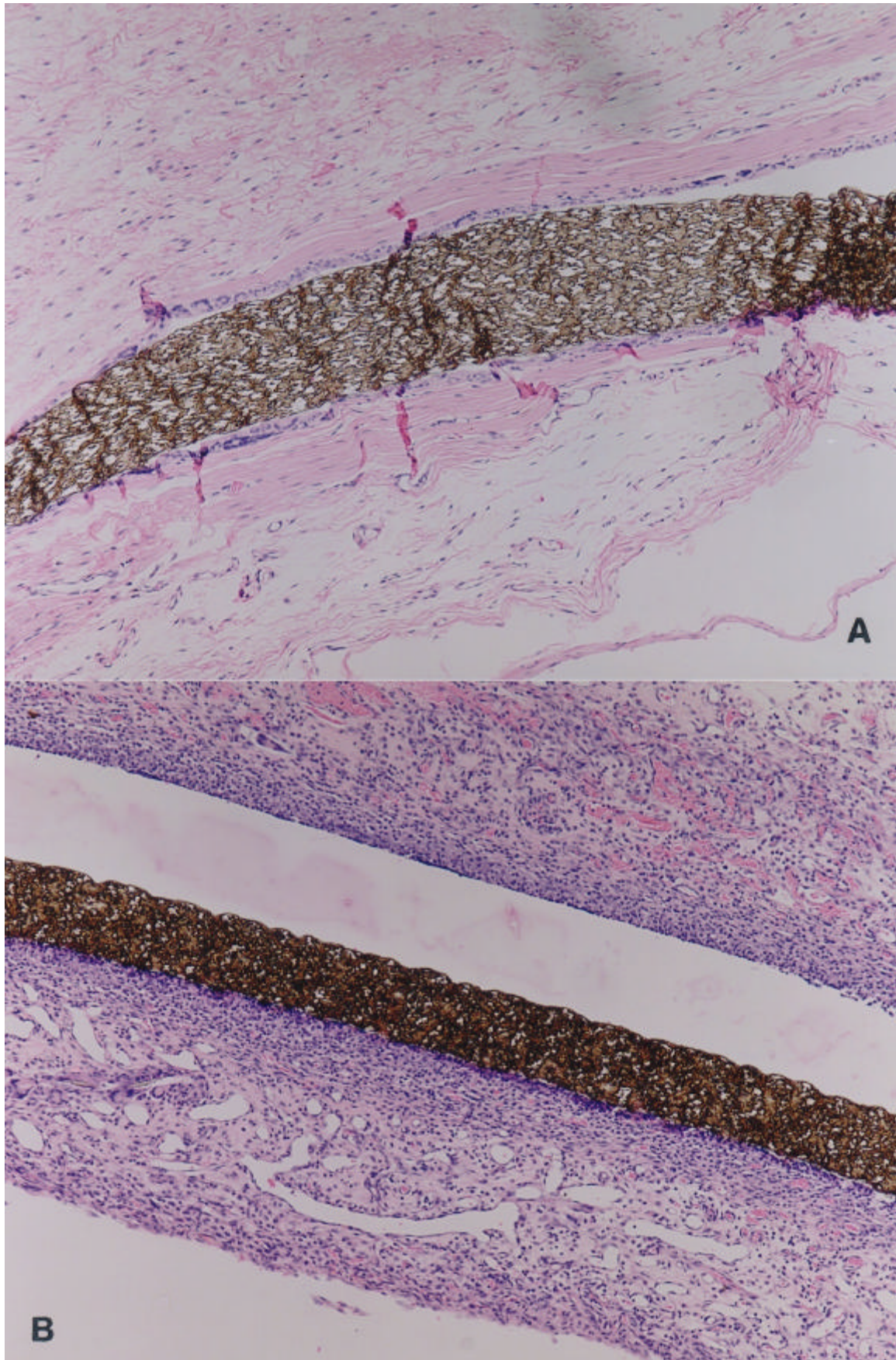
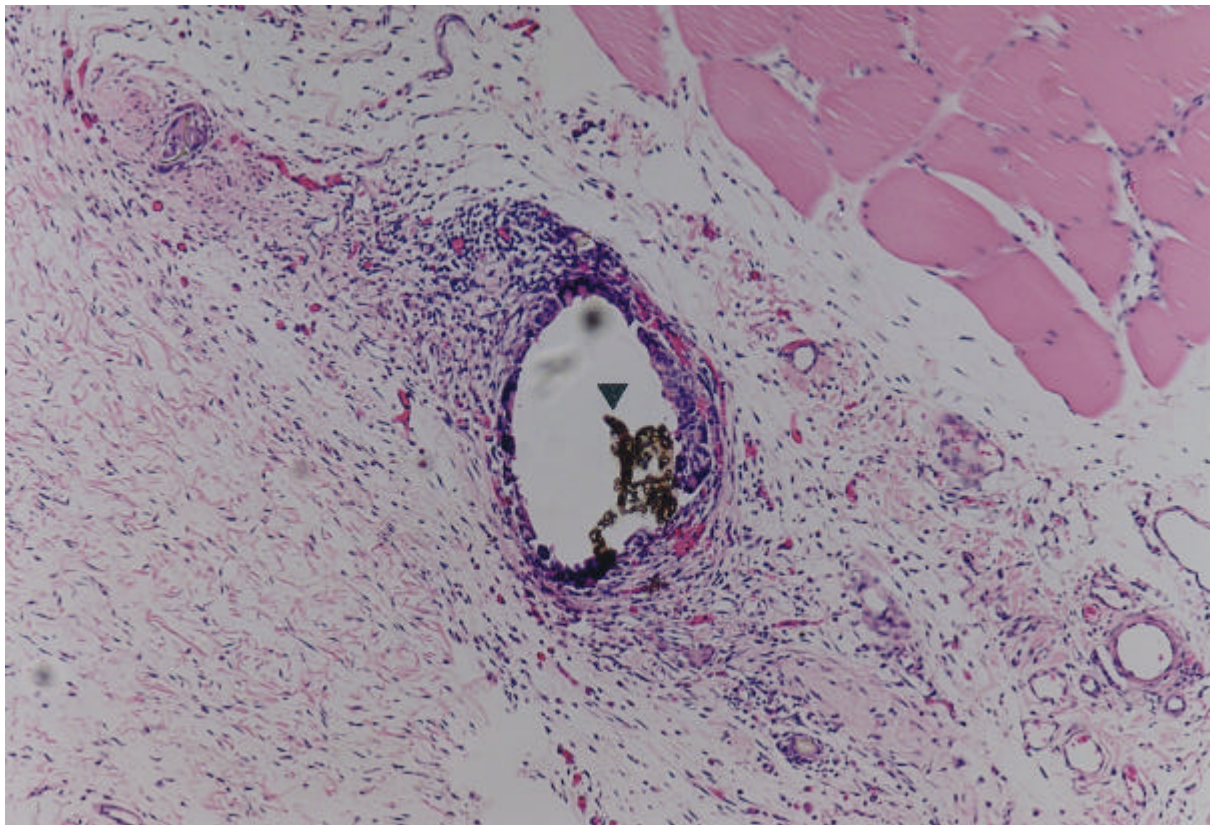


ABB. 13:

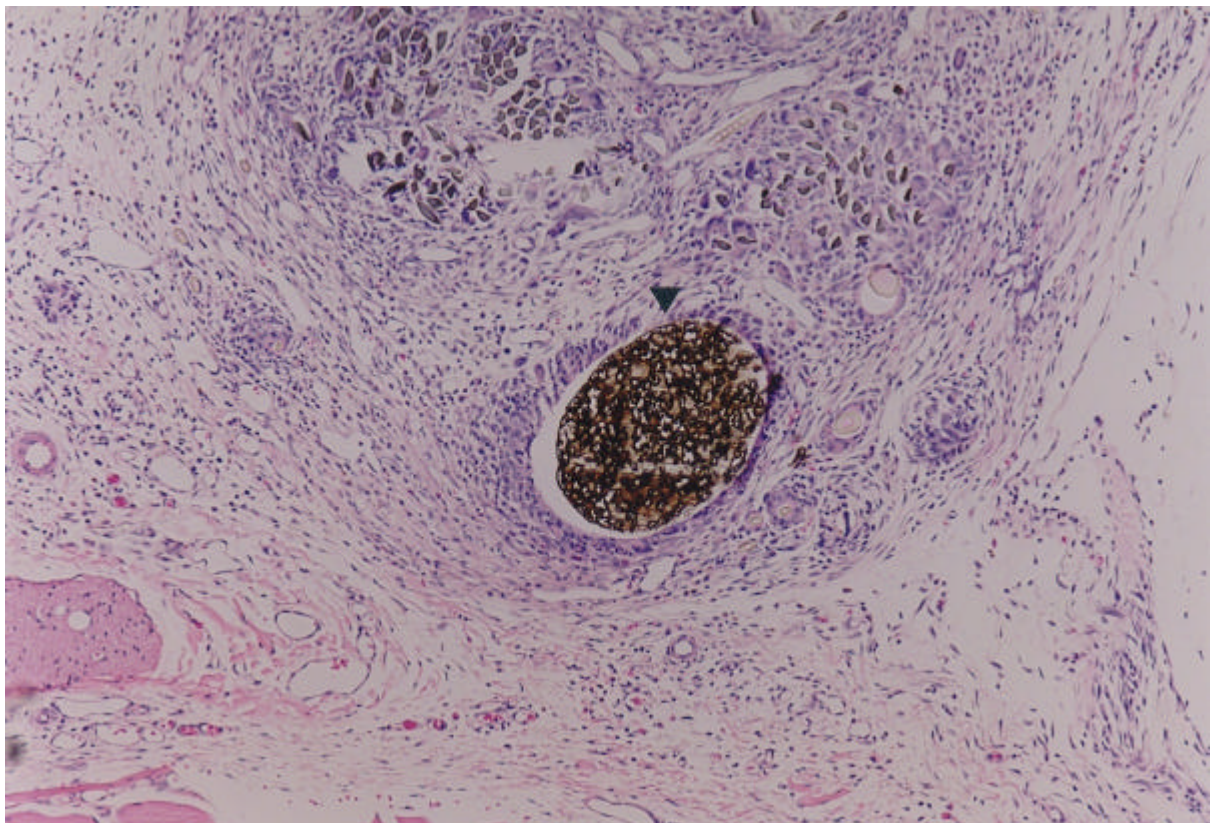
Prozentuale Verteilung Kapillaren/Präkapillaren in den einzelnen Gruppen nach Auswertung der mikroskopischen Präparate, jeweils bezogen auf die Gesamtgefäßanzahl/mm² (= 100 %) in der jeweiligen Gruppe 7–70 Tage nach Erzeugung der Ischämie. Kontrollgruppe – unbeschichteter PTFE-Faden, Collagengruppen – Collagen I beschichteter PTFE-Faden, Angiogeningruppen – Collagen I und 1,9 ng Angiogenin beschichteter PTFE-Faden.

**ABB. 14:**

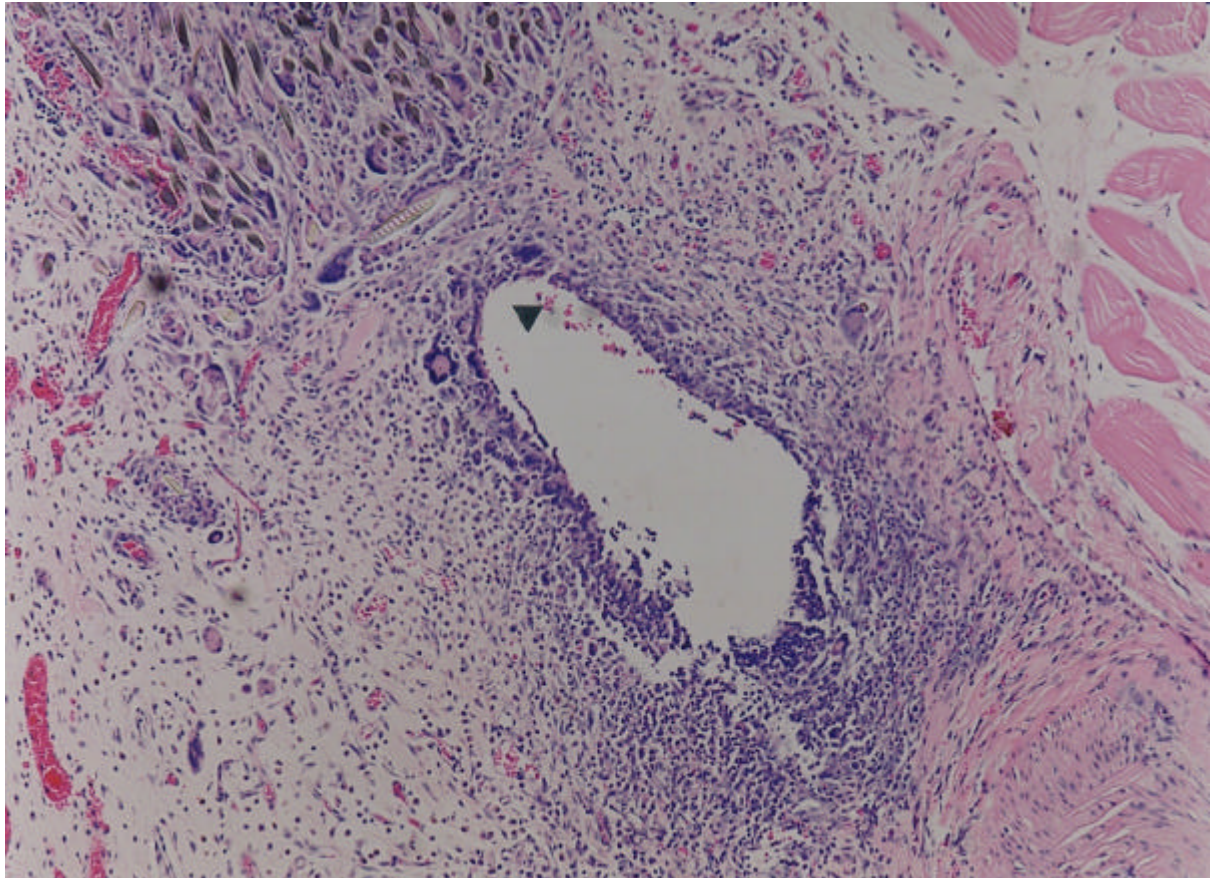
Histologisches Präparat mit längs geschnittenem 6x0 ePTFE-Faden. **A** – Präparat aus der Kontrollgruppe 7 Tage nach Ischämieinduktion, **B** - Präparat aus der 10 ng Angiogeningruppe 7 Tage nach Ischämieinduktion. Färbung: Hämatoxylin-Eosin, Vergrößerung: 100x.

**ABB. 15:**

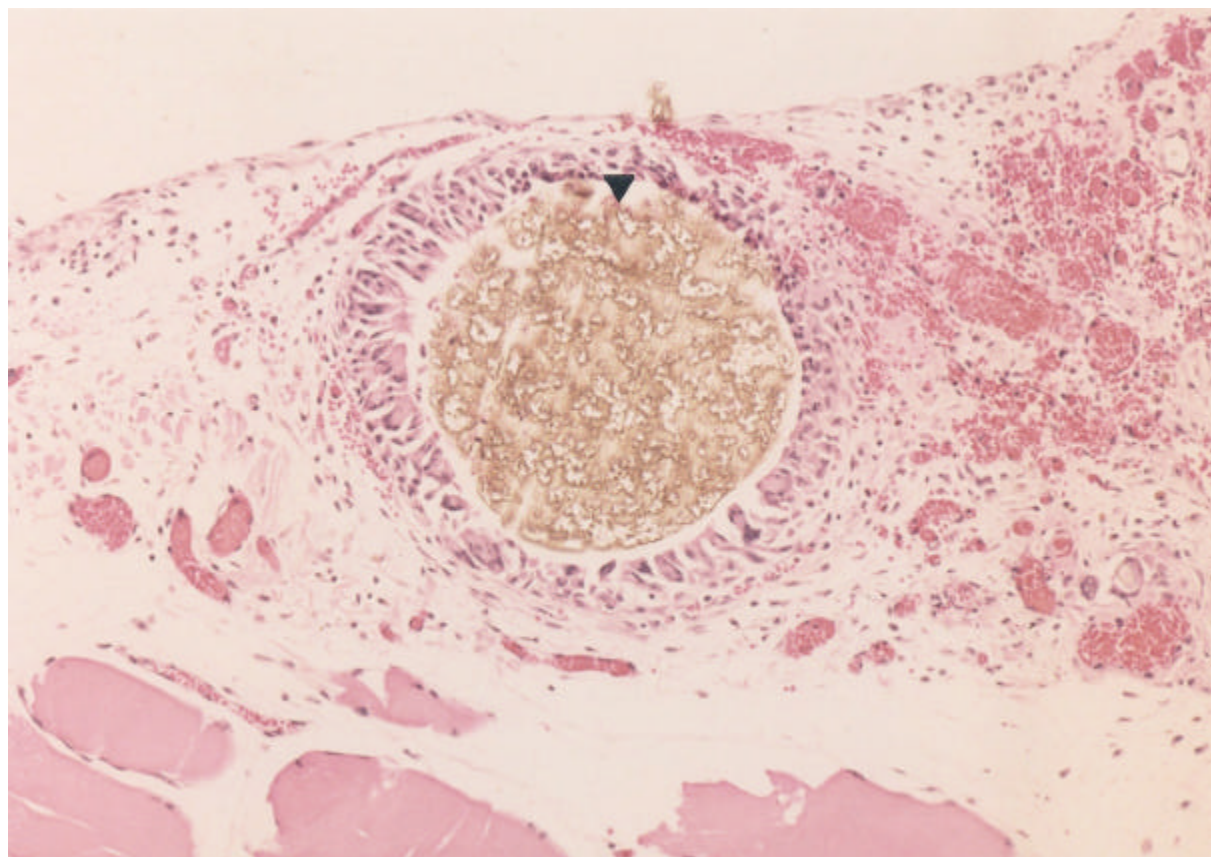
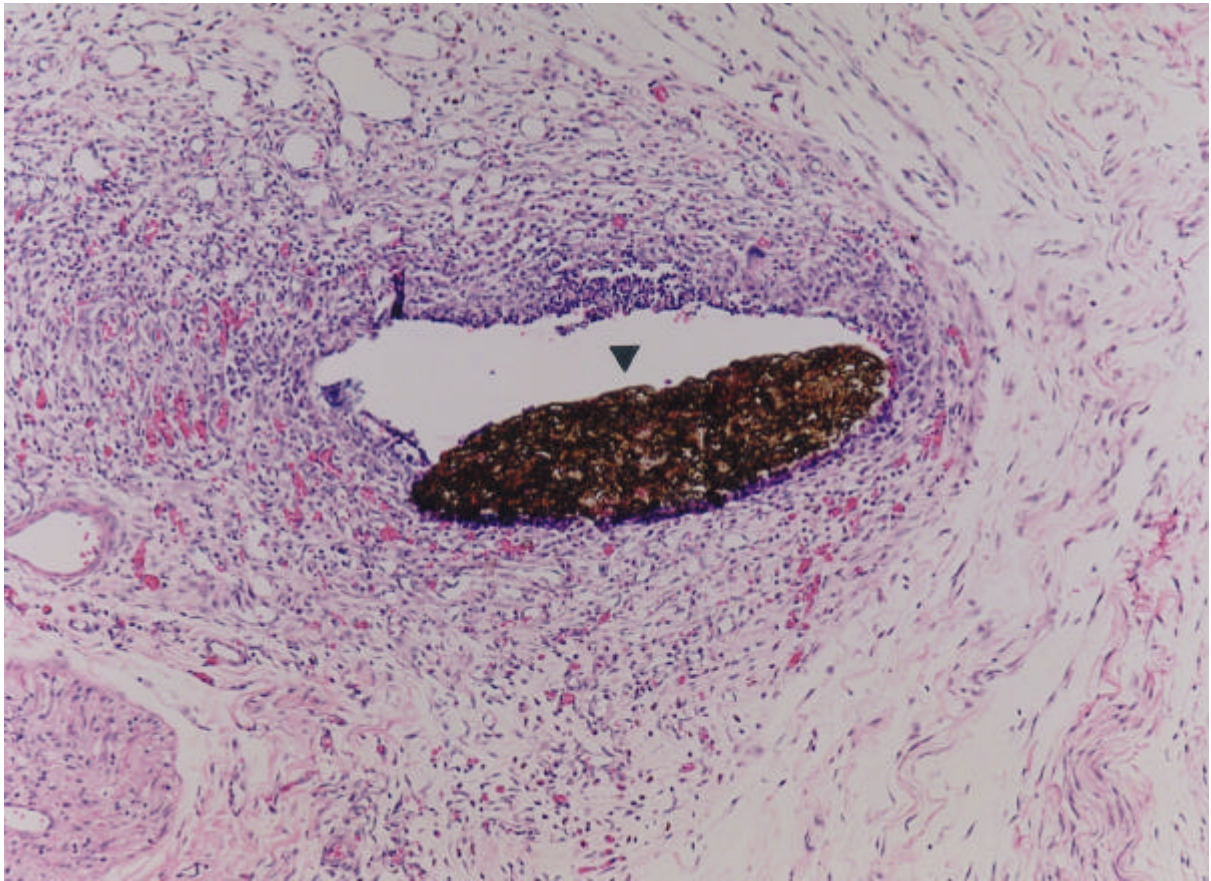
Histologisches Präparat aus der Kontrollgruppe 07 Tage nach Ischämieerzeugung. Der mit Collagen I und 1 %-iger Methylzellulose beschichtete 6x0 ePTFE-Faden ist im Bildzentrum orthograd geschnitten ↓. PTFE-Material zum großen Teil beim Anfertigen des Schnittes herausgefallen. Erythrozyten (rot) vereinzelt in den Gefäßen noch vorhanden. Färbung: Hämatoxylin-Eosin. Vergrößerung: 100x.

**ABB. 16:**

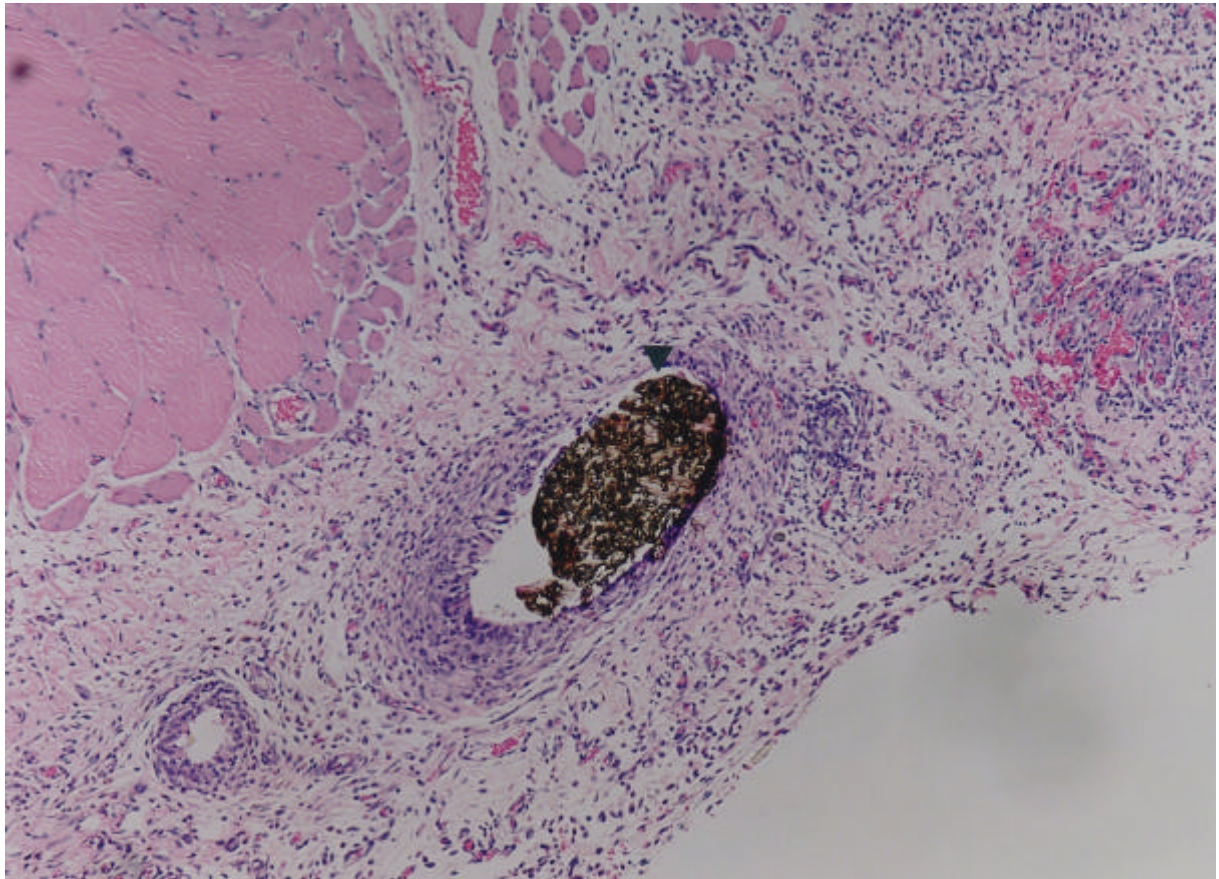
Histologisches Präparat aus der 62,5 ng bFGF-Gruppe 07 Tage nach Ischämieerzeugung. Der 1 cm lange 6x0 ePTFE-Faden ist mit Collagen I und 62,5 ng bFGF in 1 %-iger Methylzellulose beschichtet. Der Faden ist im Bildzentrum orthograd geschnitten ↓. Erythrozyten (rot) vereinzelt in den Gefäßen noch vorhanden. Färbung: Hämatoxylin-Eosin. Vergrößerung: 100x.

**ABB. 17:**

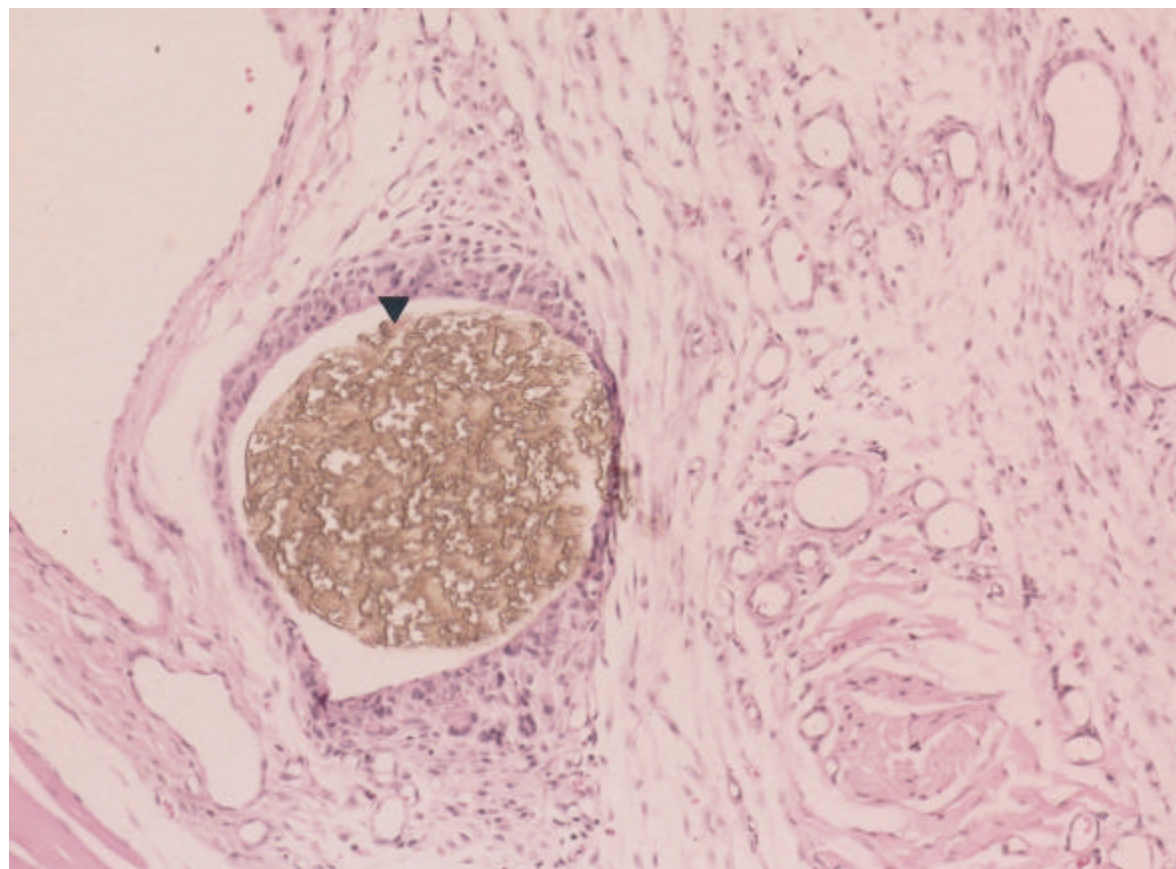
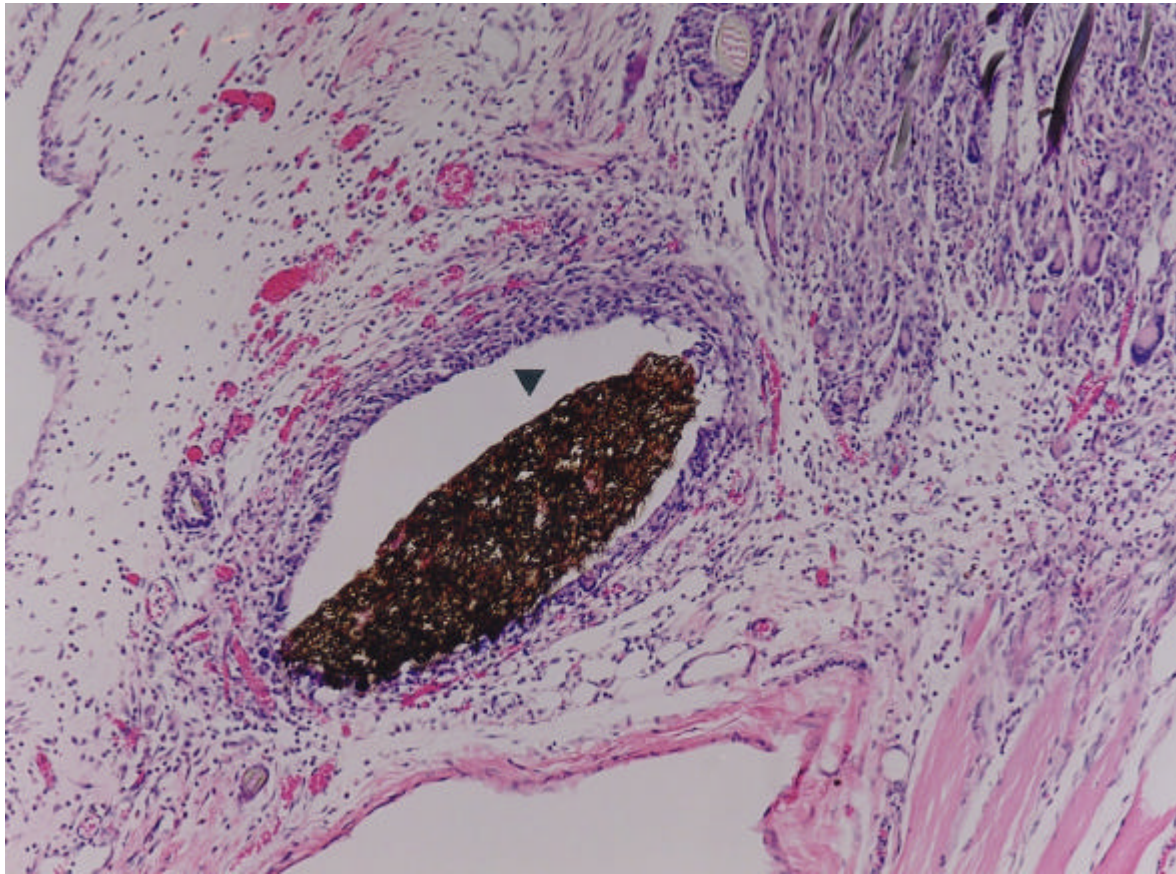
Histologisches Präparat aus der 125 ng bFGF-Gruppe 07 Tage nach Ischämieerzeugung. Der 1 cm lange 6x0 ePTFE-Faden ist mit Collagen I und 125 ng bFGF in 1 %-iger Methylzellulose beschichtet. Der Faden ist in Bildmitte schräg geschnitten ↓. PTFE-Material beim Anfertigen des Schnittes herausgefallen. Erythrozyten (rot) vereinzelt in den Gefäßen noch vorhanden. Färbung: Hämatoxylin-Eosin. Vergrößerung: 100x

**ABB. 18:**

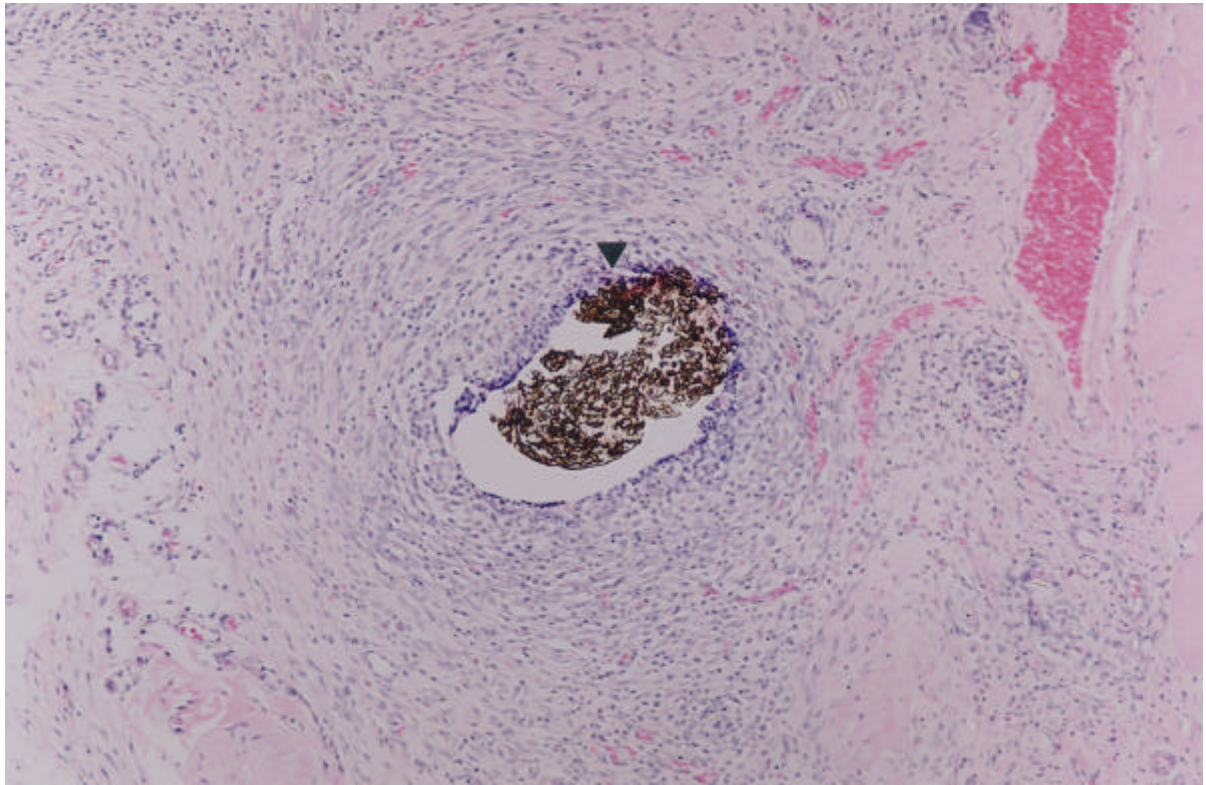
Histologisches Präparat aus der 250 ng bFGF-Gruppe 7 Tage nach Ischämieerzeugung. Der 1 cm lange 6x0 ePTFE-Faden ist mit Collagen I und 250 ng bFGF in 1 %-iger Methylzellulose beschichtet. Der Faden ist im Bildzentrum orthograd geschnitten ↓. Erythrozyten (rot) zum Teil in den Gefäßen noch vorhanden. Oben: Färbung Hämatoxylin-Eosin. Vergrößerung: 100x. Unten: Färbung Resorcin-fuchsin- van Gieson. Vergrößerung: 200x.

**ABB. 19:**

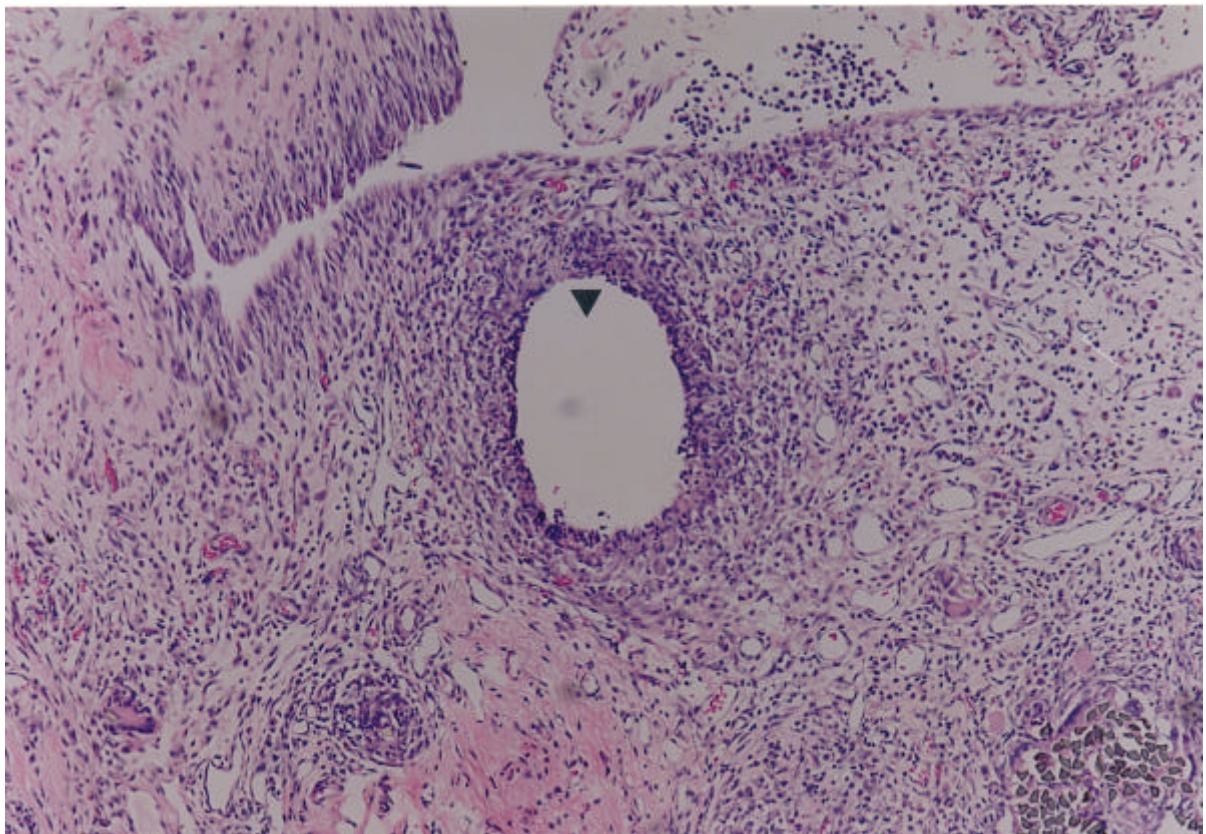
Histologisches Präparat aus der 10 ng Angiogenin-Gruppe 7 Tage nach Ischämieerzeugung. Der 1 cm lange 6x0 ePTFE-Faden ist mit Collagen I und 10 ng Angiogenin in 1 %-iger Methylzellulose beschichtet. Der Faden ist im Bildzentrum orthograd geschnitten ↓. Erythrozyten (rot) vereinzelt in den Gefäßen noch vorhanden. Färbung: Hämatoxylin-Eosin. Vergrößerung: 100x.

**ABB. 20:**

Histologisches Präparat aus der 100 ng Angiogenin-Gruppe 7 Tage nach Ischämieerzeugung. Der 1 cm lange 6x0 ePTFE-Faden ist mit Collagen I und 100 ng Angiogenin in 1 %-iger Methylzellulose beschichtet. Der Faden ist im Bildzentrum orthograd geschnitten ▼. Erythrozyten (rot) zum Teil in den Gefäßen noch vorhanden. Färbung: Hämatoxylin-Eosin. Oben: Vergrößerung: 100x. Unten: 200x.

**ABB. 21:**

Histologisches Präparat aus der 1000 ng Angiogenin-Gruppe 7 Tage nach Ischämieerzeugung. Der 1 cm lange 6x0 ePTFE-Faden ist mit Collagen I und 1000 ng Angiogenin in 1 %-iger Methylzellulose beschichtet. Der Faden ist im Bildzentrum orthograd geschnitten ↓. Erythrozyten (rot) zum Teil in den Gefäßen noch vorhanden. Färbung: Hämatoxylin-Eosin. Vergrößerung: 100x.

**ABB. 22:**

Histologisches Präparat aus der 10000 ng Angiogenin-Gruppe 7 Tage nach Ischämieerzeugung. Der 1 cm lange 6x0 ePTFE-Faden ist mit Collagen I und 10000 ng Angiogenin in 1 %-iger Methylzellulose beschichtet. Der Faden ist im Bildzentrum orthograd geschnitten ↓. Das PTFE-Fadenmaterial ist beim Anfertigen des Schnittes herausgefallen. Erythrozyten (rot) zum Teil in den Gefäßen noch vorhanden. Färbung: Hämatoxylin-Eosin. Vergrößerung: 100x.

Anzahl der Gefäße 7 Tage nach induzierter Ischämie Vergleich der Wirkung von Angiogenin und bFGF

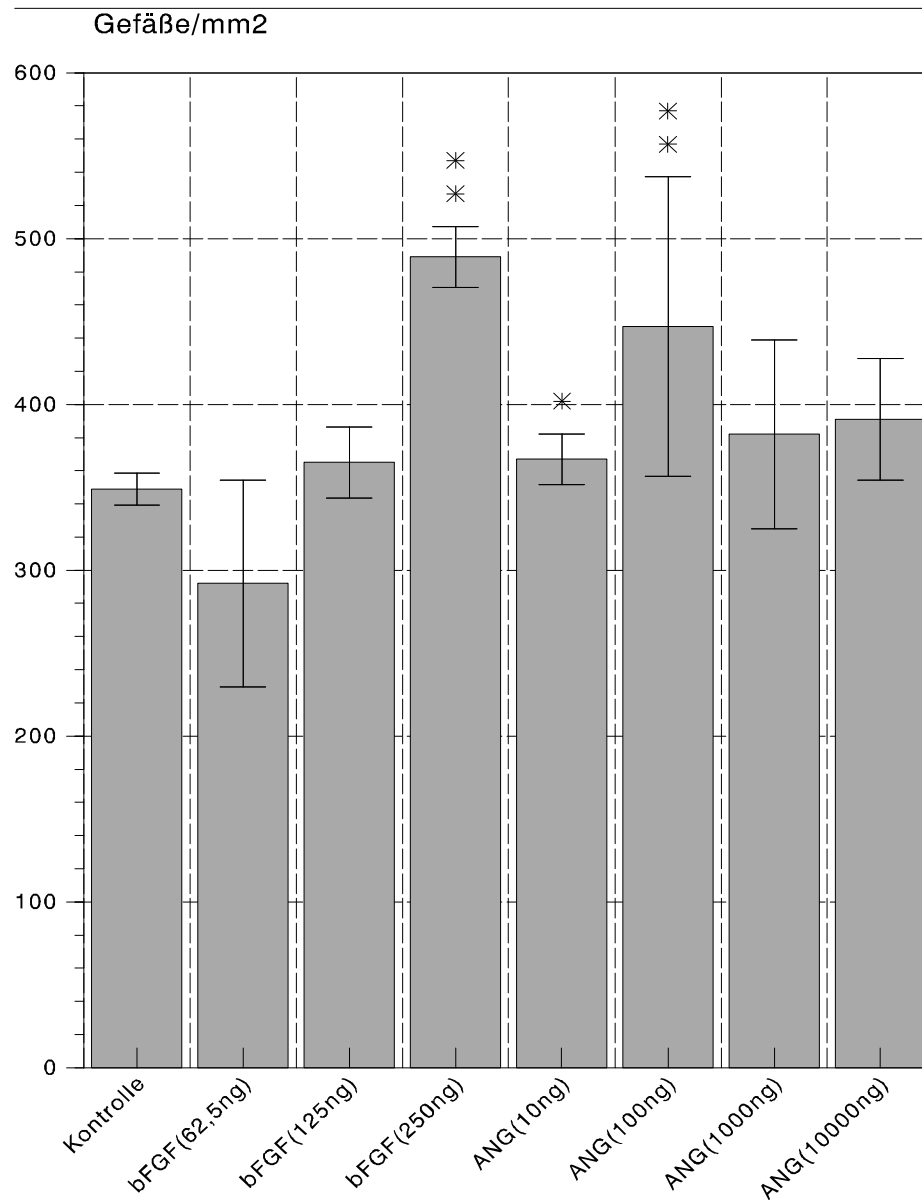


ABB. 23:

Gesamtzahl aller Gefäße/mm² mit einem Durchmesser von $> 5\mu\text{m}$ bis $< 300\mu\text{m}$ nach den Kriterien von TABELLE 1 und 2, 7 Tage nach Ischämieinduktion in den Rattenhinterbeinen und lokaler Applikation verschiedener Mengen von Angiogenin und bFGF. Gezählt wurden alle Gefäße in einem Radius von $r = 0,575\text{ mm}$ um den implantierten $6 \times 0\text{ PTFE}$ -Faden ($d = 0,23\text{ mm}$). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem einseitigen Wilcoxon Rang Summen Test. Balken = Standardabweichung, * = signifikant, ** = hoch signifikant

Gefäßverteilung in Prozent 7 Tage nach induzierter Ischämie Vergleich der Wirkung von bFGF und Angiogenin

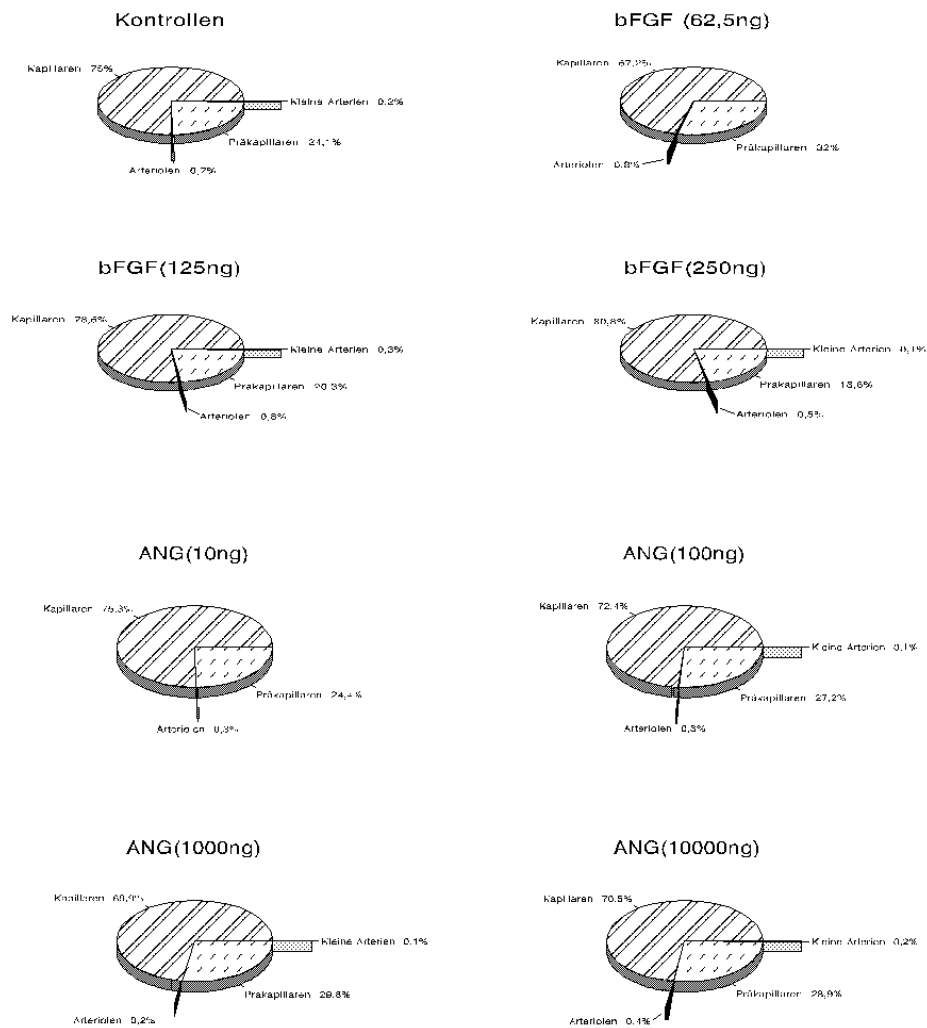


ABB. 24:

Verhältnis von Kapillaren, Präkapillaren, Arteriolen und kleinen Arterien in Prozent in der jeweiligen Gruppe, 7 Tage nach Ischämieinduktion. Als 100 % Bezugswert diente die Gesamtgefäßanzahl/mm² in der jeweiligen Gruppe.



ABB. 25:
Größenvergleich der 5cm langen ePTFE-Prothese (Ø 2 mm) mit einem Streichholz [Vergrößerung: 3,3x].

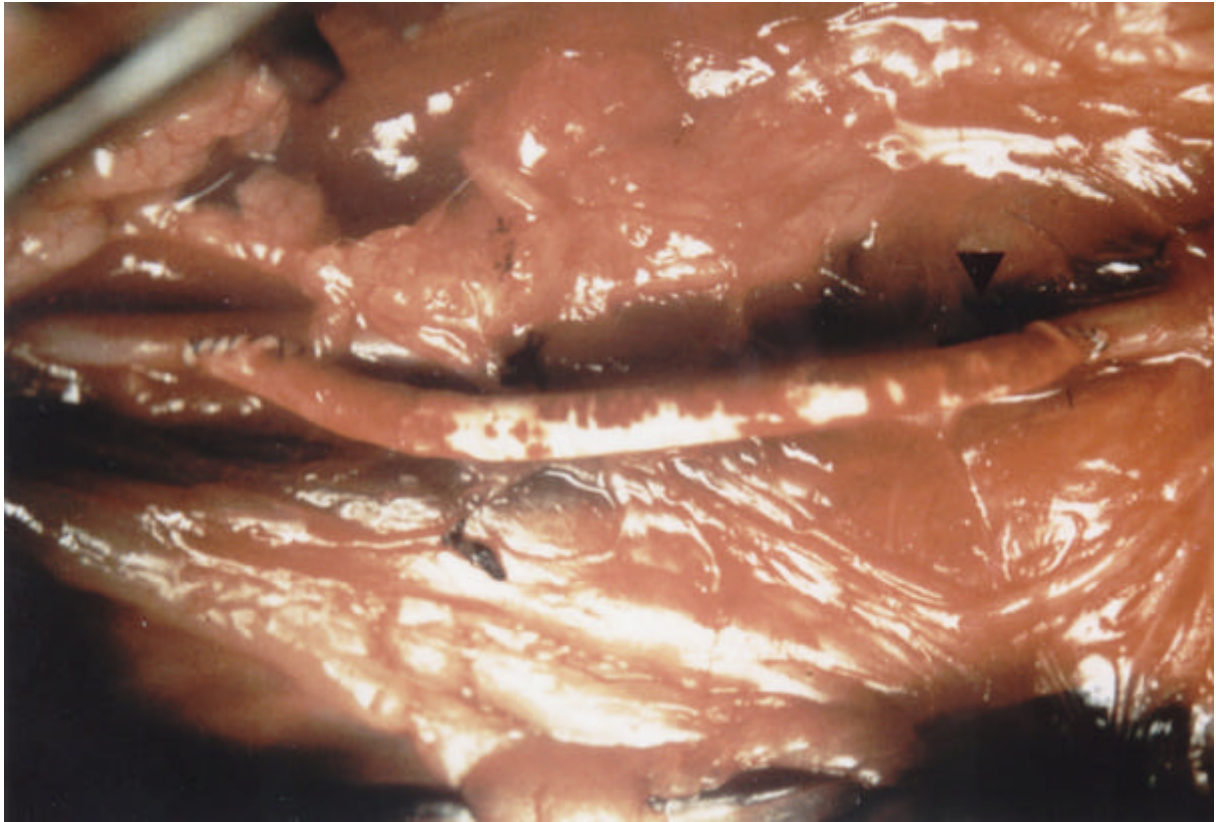
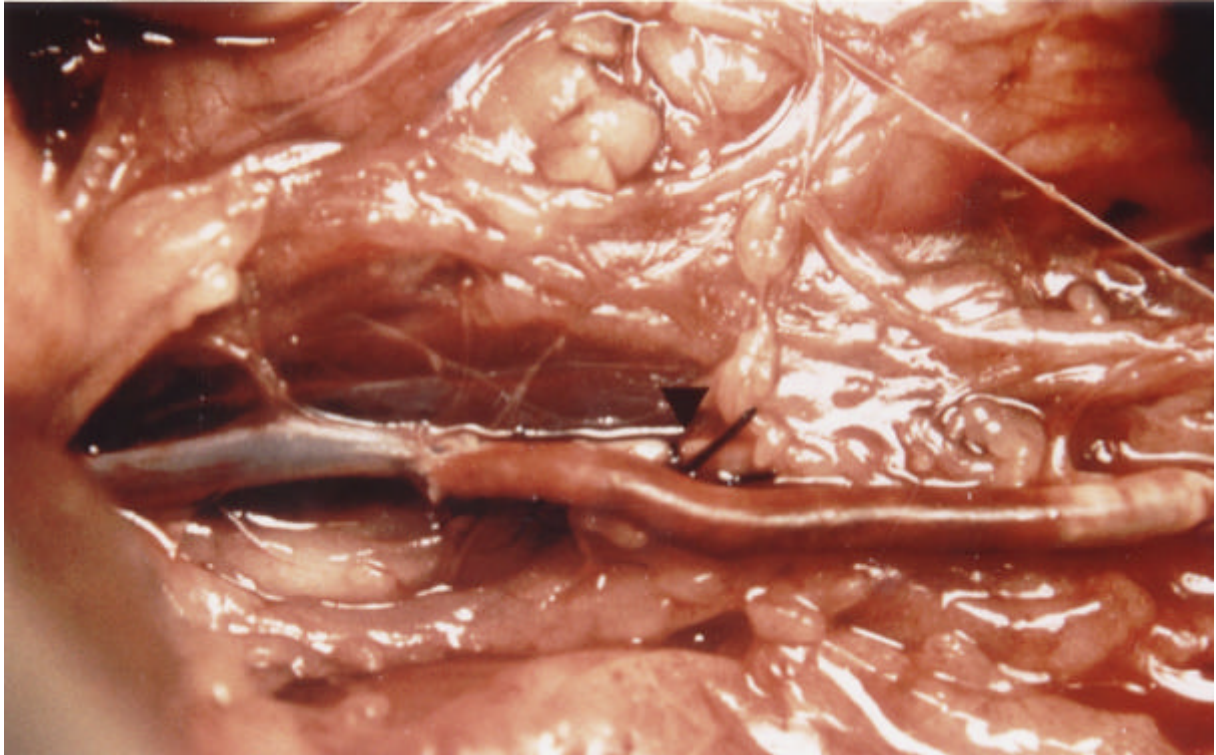


ABB. 26:
Offene PTFE-Prothese beschichtet mit Angiogenin und bFGF in situ. ↓ Ligatur der abdominalen Aorta nahe der distalen Anastomose [Vergrößerung: 3x].



ABB. 27:
PTFE-Prothese beschichtet mit Angiogenin und bFGF 24h nach der Implantation.
↔↔ kleiner Thrombus im Bereich der distalen Anastomose [Vergrößerung: 3x].

**ABB. 28:**

Vollständig thrombosierte Heparin-beschichtete PTFE-Prothese 1,5h nach der Implantation in situ. Die Ligatur der Aorta nahe der distalen Anastomose zeigt der ↓ [Vergrößerung: 3x].

**ABB. 29:**

bFGF beschichtete Prothese vollständig thrombosierte 6,5h nach der Implantation (→→ entfernter okkludierender Thrombus) [Vergrößerung: 3x].

Reinigungsschritte von 32P-Proteinen nach Phosphorylierung durch PKC

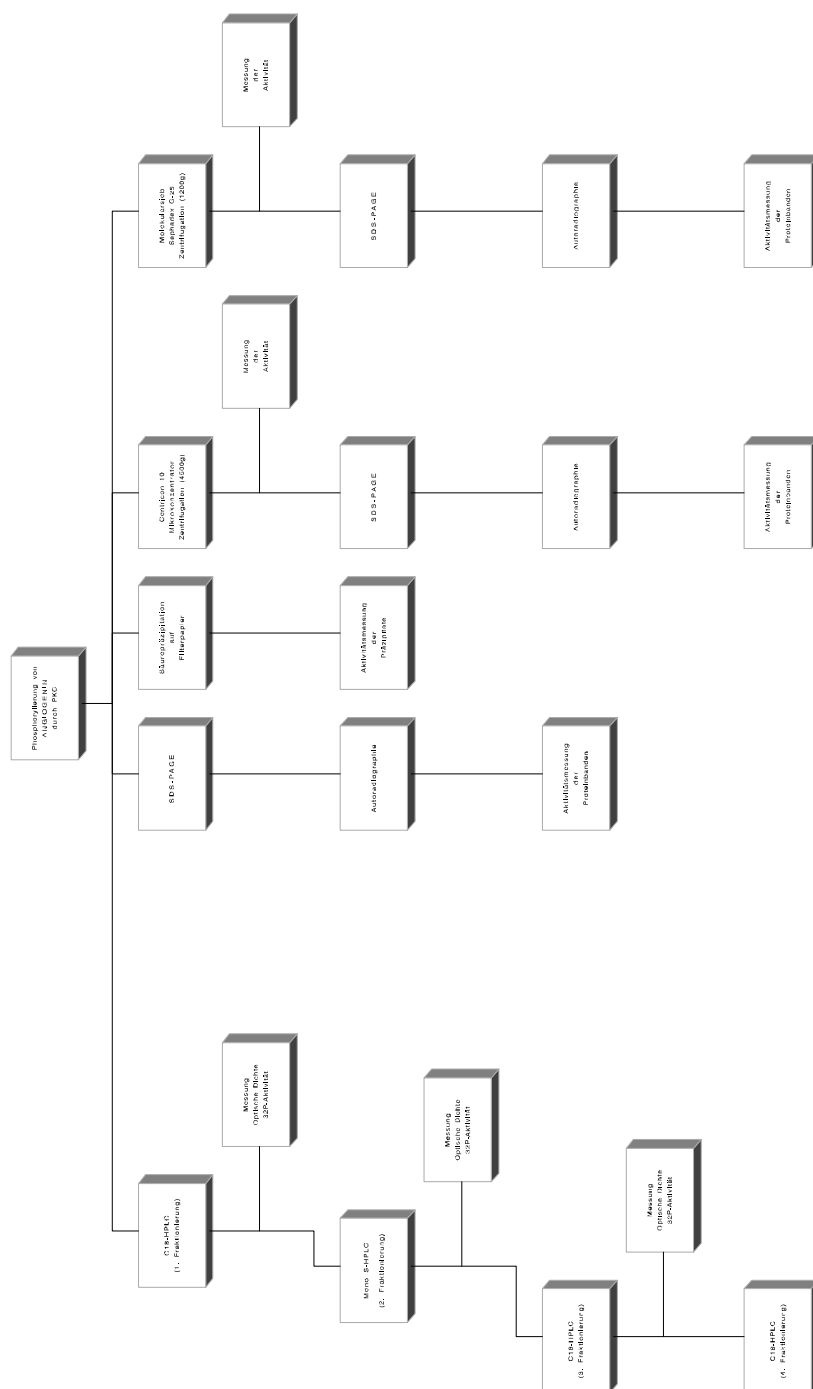
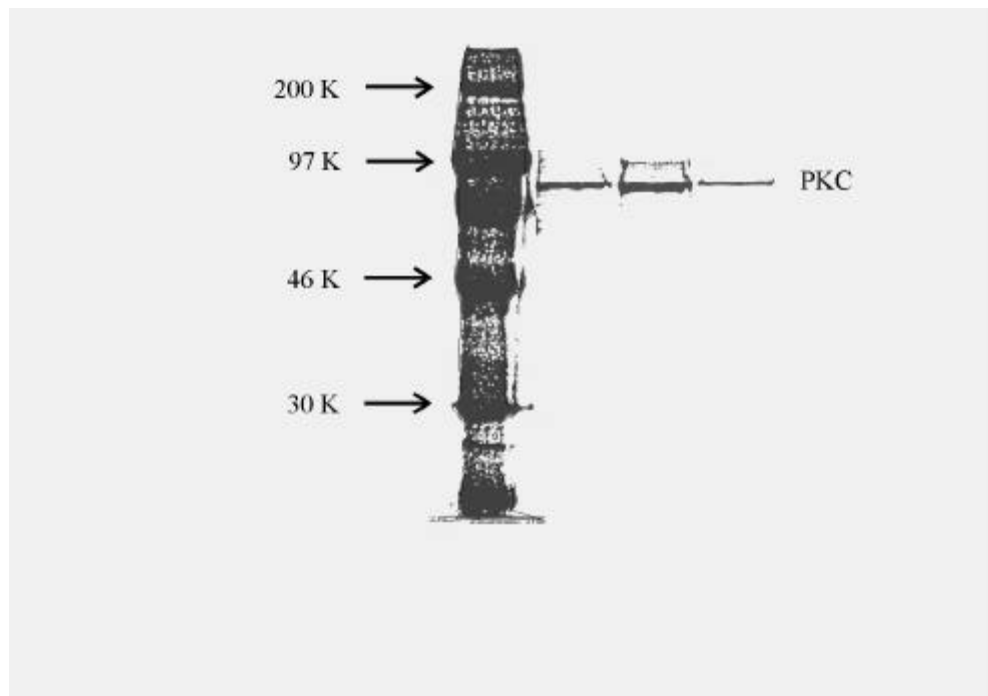
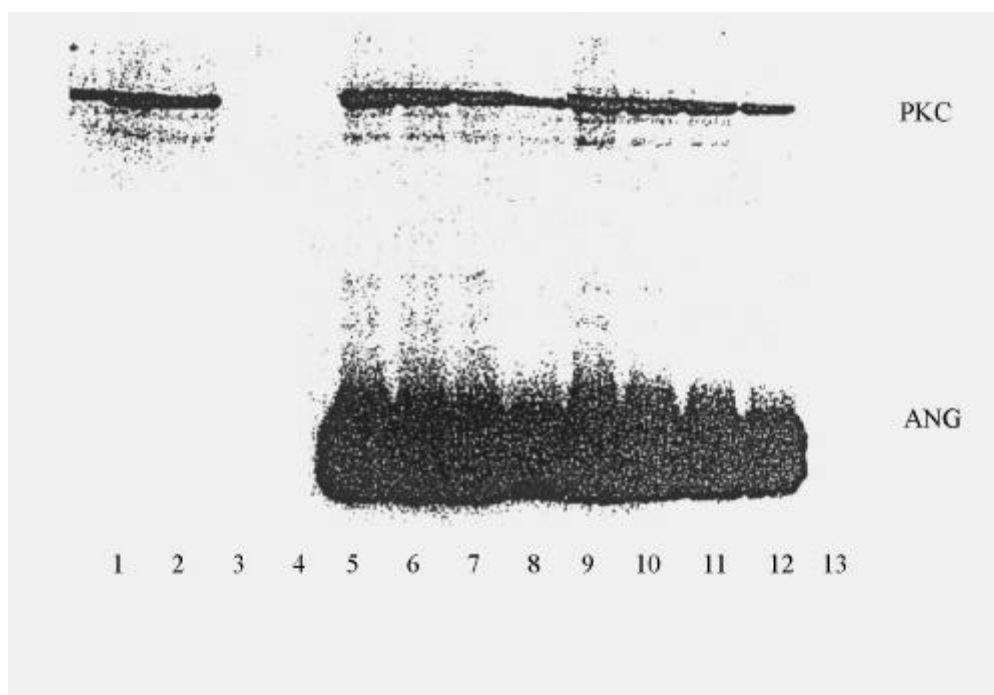


ABB. 30:
Schematische Darstellung der Reinigungsschritte von 32P-Proteinen nach Phosphorylierung durch PKC.

**ABB. 30 A:**

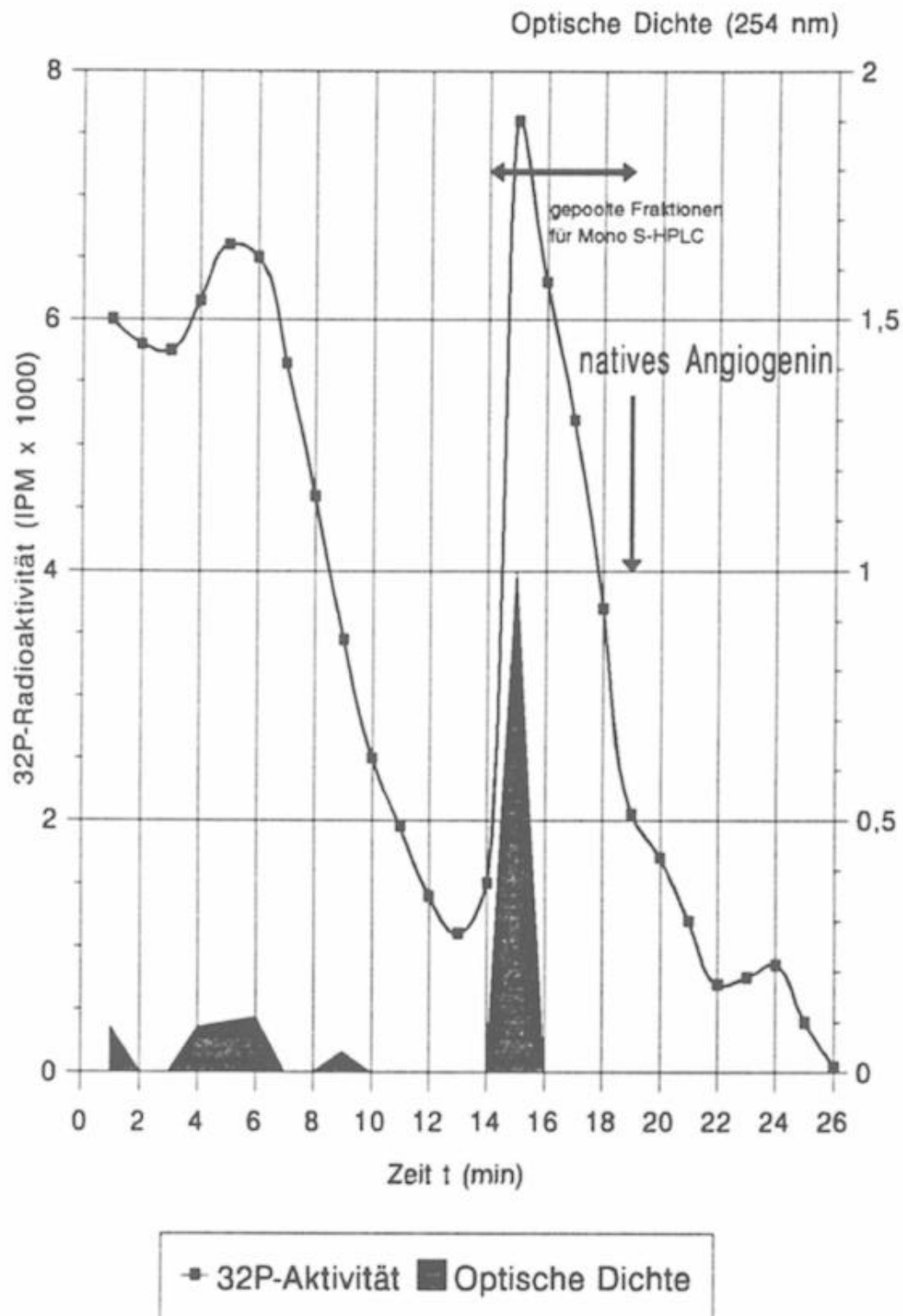
15 % SDS-PAGE der isolierten Proteinkinase C aus Rattenhirnen nach einer Methode von Walton et al. (1987). PROTEINFÄRBUNG mit Coomassie blue.

- # 1: Proteinstandard
- # 2: PKC-Fraktion I (100 µg/ml)
- # 3: PKC-Fraktion II (100 µg/ml)
- # 4: PKC-Fraktion III (100 µg/ml)

**ABB. 30 B:**

12,5 % SDS-PAGE autophosphorylierter PKC und von PKC phosphoryliertem humanem Angiogenin Hoechst (Batch I). Untersuchung des Effektes von Reaktionszeit und CaCl_2 . (AUTORADIOGRAMM, Expositionszeit: 18,5 h).

#	PKC	hANG (250 µg/ml)	CaCl_2 (mM)	Reaktionszeit (min)
1	+	-	0,75	30
2	+	-	0,75	10
3	-	+	0,75	30
4	-	+	0,75	10
5	+	+	0,125	30
6	+	+	0,125	20
7	+	+	0,125	10
8	+	+	0,125	5
9	+	+	0,75	30
10	+	+	0,75	20
11	+	+	0,75	10
12	+	+	0,75	5
13	+	+	0,75	0

**ABB. 31 A:**

C18-HPLC Elutionsprofil von ^{32}P -Angiogenin nach Phosphorylierung durch PKC (1. Präparation). Darstellung der optischen Dichte und der ^{32}P -Aktivität der Fraktionen.

C18-HPLC (2. Präparation) nach Phosphorylierung von humanem ANGIOGENIN durch PKC

Darstellung der optischen Dichte und der ^{32}P -Aktivität der Fraktionen

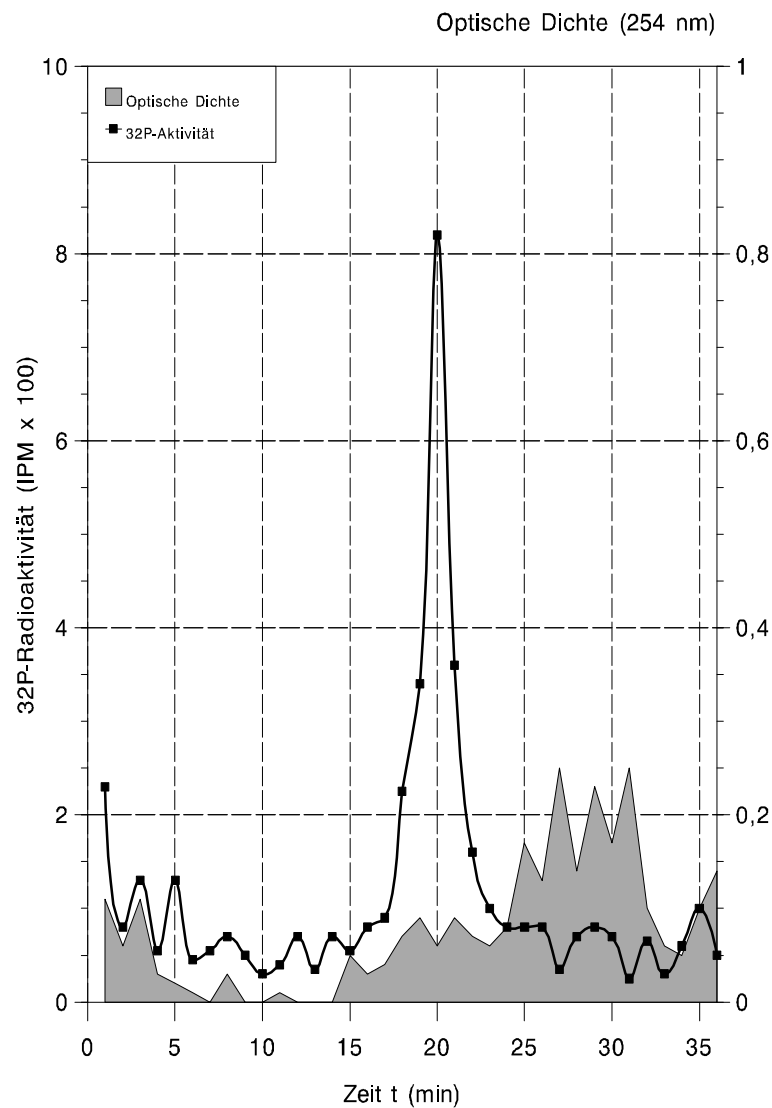


ABB. 31 B:

C18-HPLC Elutionsprofil von ^{32}P -Angiogenin nach Phosphorylierung durch PKC (2. Präparation). Darstellung der optischen Dichte und der ^{32}P -Aktivität der Fraktionen.

Mono S-HPLC der gepoolten Fraktionen nach erster C18-HPLC-
Präparation von PKC-phosphoryliertem humanem ANGIOGENIN
Darstellung der optischen Dichte und der ^{32}P -Aktivität der Fraktionen

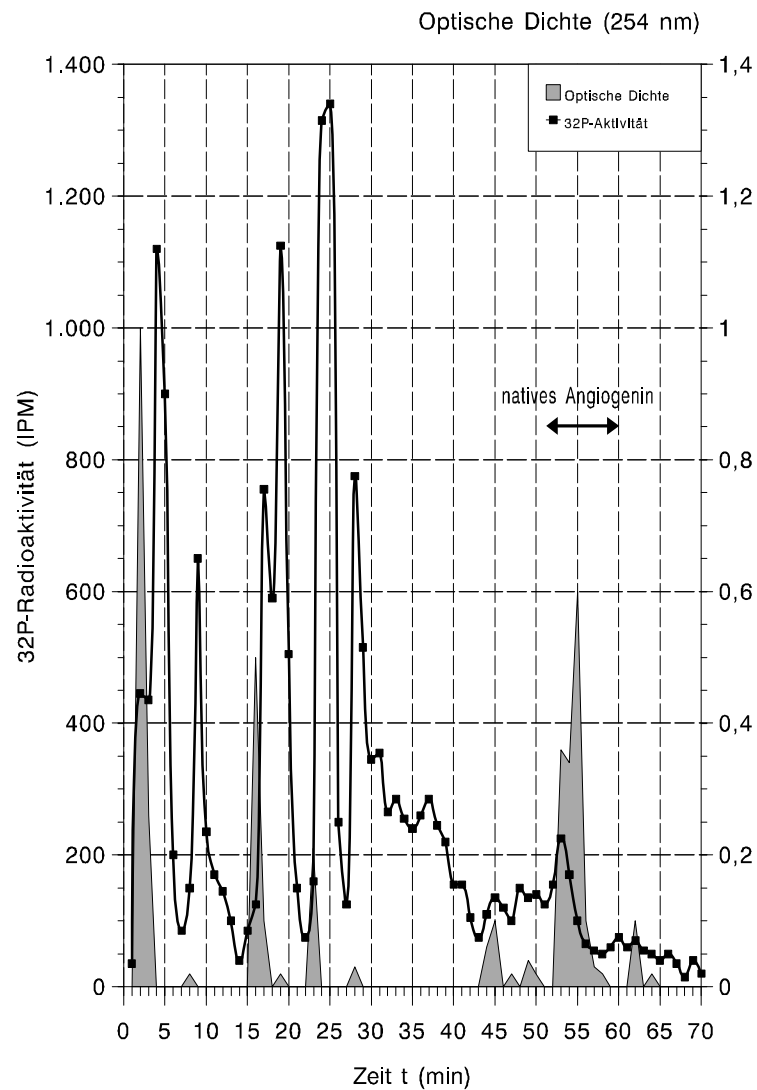


ABB. 31 C:

Mono S-HPLC der gepoolten Fraktionen nach erster C18-HPLC-Präparation von PKC-phosphoryliertem humanem Angiogenin. Darstellung der optischen Dichte und der ^{32}P -Aktivität der Fraktionen.

C18-HPLC (3. Präparation) nach Phosphorylierung von humanem ANGIOGENIN durch PKC

Darstellung der optischen Dichte und der ^{32}P -Aktivität der Fraktionen

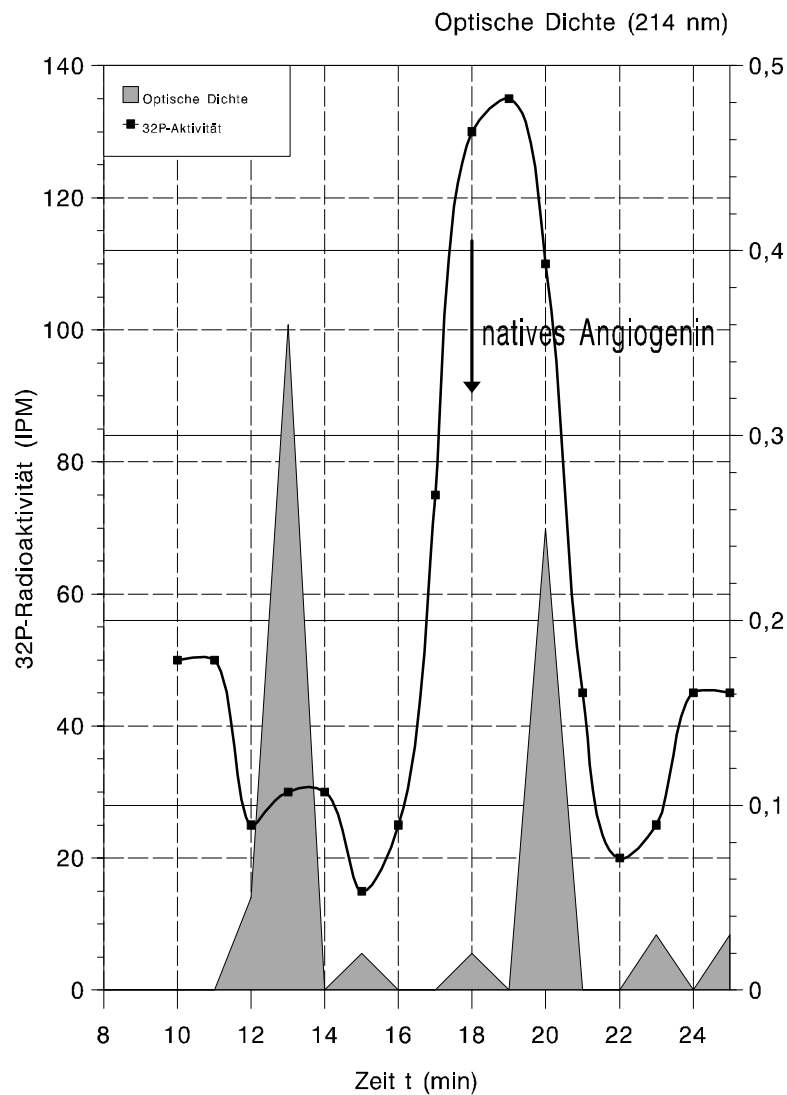
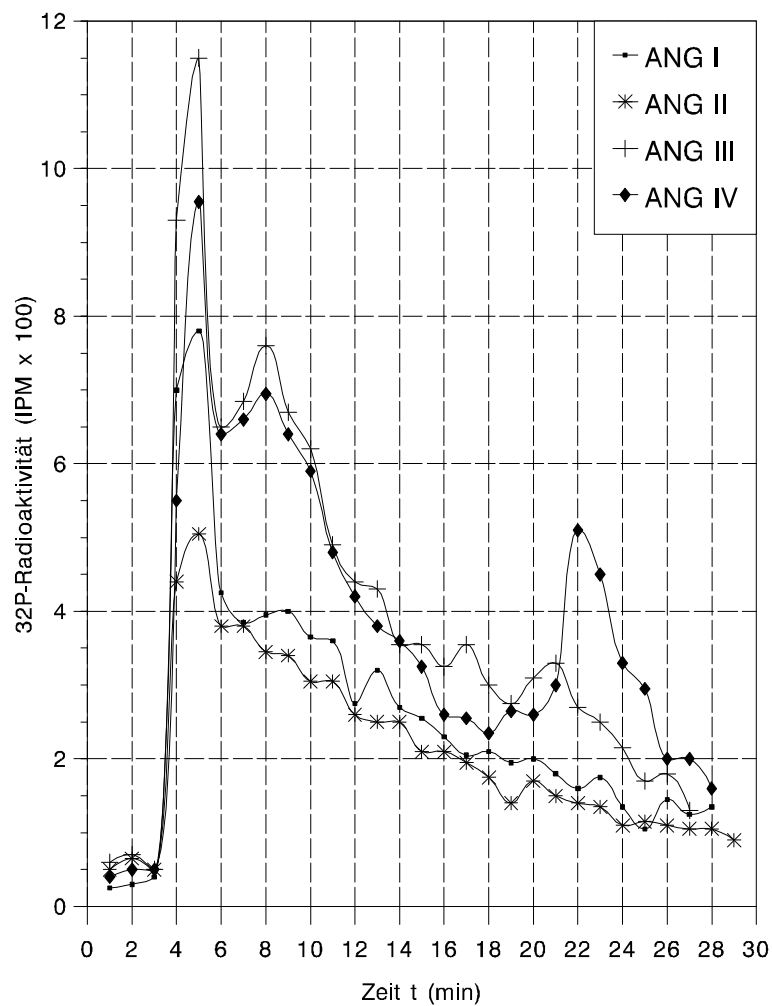


ABB. 31 D:

C18-HPLC Elutionsprofil von ^{32}P -Angiogenin nach Phosphorylierung durch PKC (3. Präparation). Darstellung der optischen Dichte und der ^{32}P -Aktivität der Fraktionen.

Vergleich der C18-HPLC-Elutionsprofile verschiedener humaner
 ^{32}P -ANGIOGENINE nach Phosphorylierung durch PKC
 Darstellung der ^{32}P -Aktivität der Fraktionen



ANG I: Mono S-HPLC gereinigtes hANG Hoechst; ANG II: hANG Hoechst in Mono S Puffer
 ANG III: hANG Hoechst in H₂O; ANG IV: hANG rekomb. aus BHK in H₂O

ABB. 32:

Vergleich der C18-HPLC-Elutionsprofile verschiedener humaner ^{32}P -Angiogenine nach Phosphorylierung durch PKC. Darstellung der ^{32}P -Aktivität der Fraktionen.

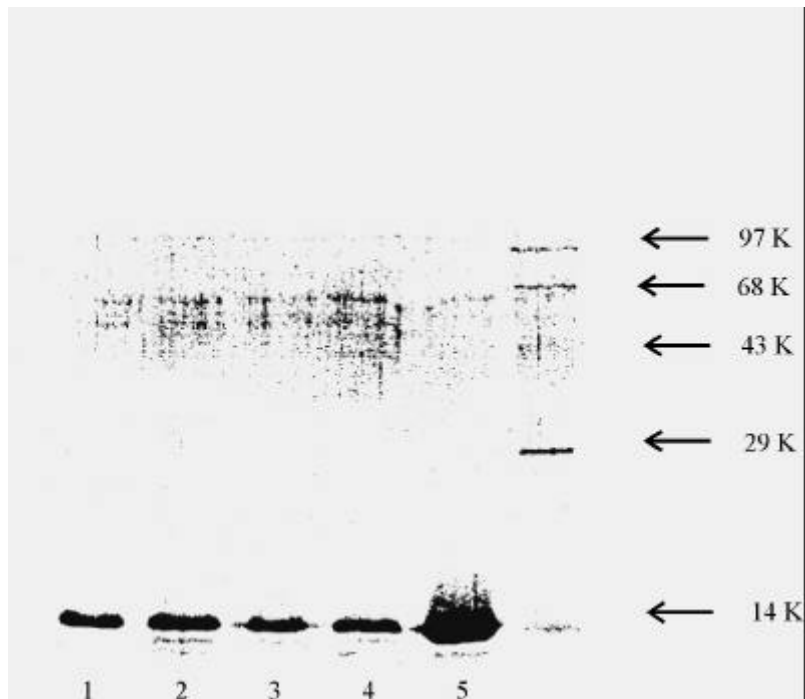


Abb. 33 A

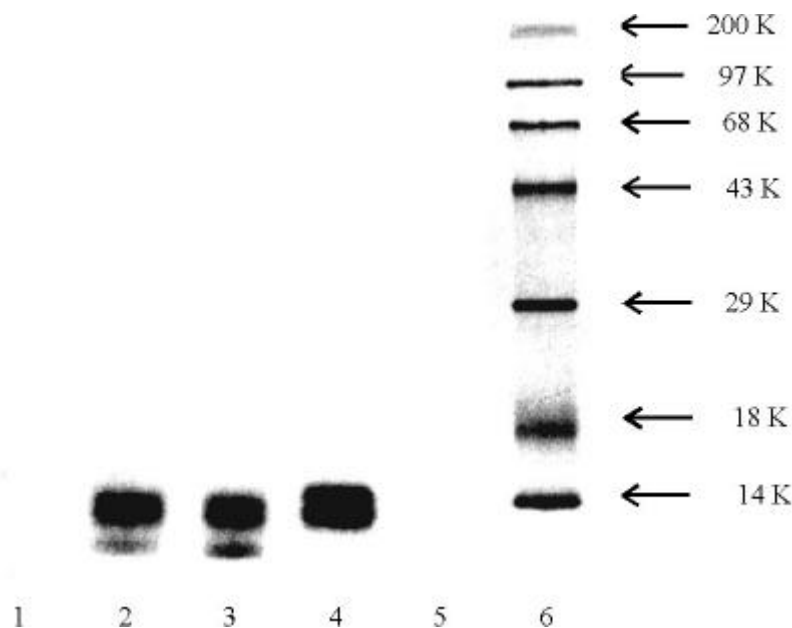


Abb. 33 B

ABB. 33:

SDS-PAGE 12,5 % verschiedener humaner ^{32}P -Angiogenine nach Phosphorylierung durch PKC.

A - PROTEINFÄRBUNG mit Coomassie blue

B - AUTORADIOGRAMM (Exposition: 24 h)

1 - ^{32}P -Phosphorylierungsreaktionsansatz plus humanem Angiogenin (Hoechst) ohne PKC

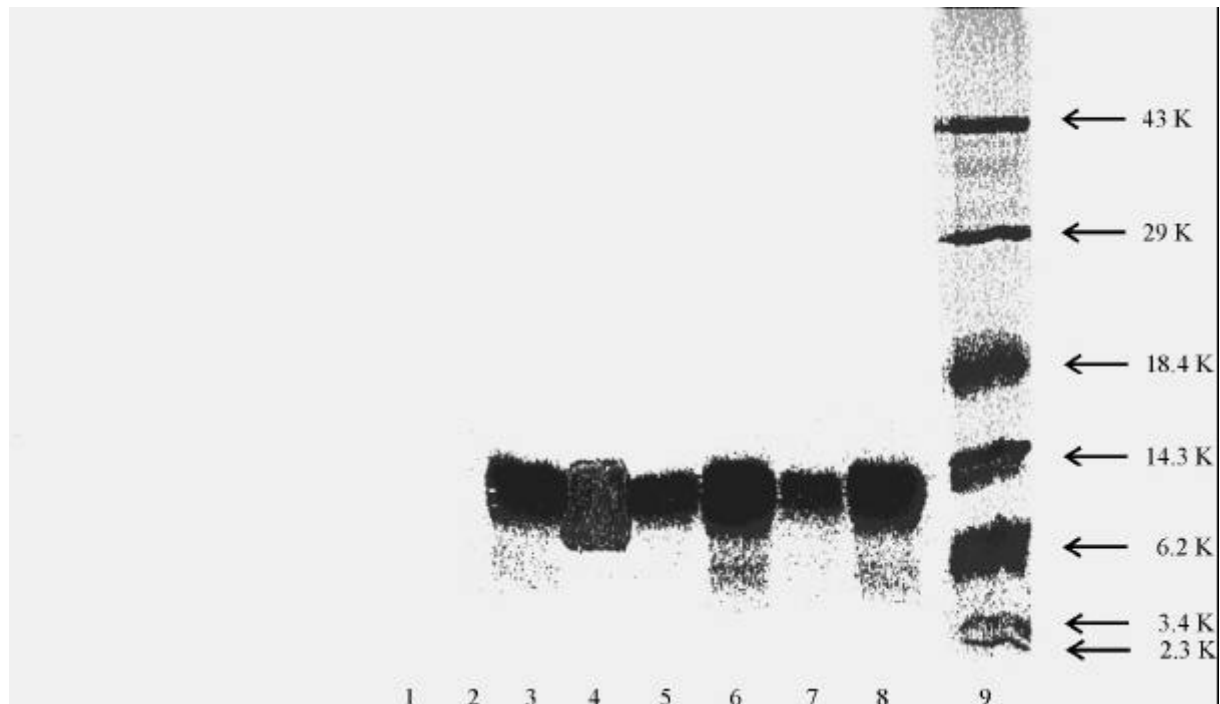
2 - Humanes ^{32}P -Angiogenin (Hoechst) in Mono S-HPLC Puffer

3 - Humanes ^{32}P -Angiogenin (Hoechst) in H_2O

4 - Humanes ^{32}P -Angiogenin (BHK) in H_2O

5 - ^{32}P -Phosphorylierungsreaktionsansatz plus humanen Angiogenin (Hoechst), plus PKC, aber ohne Stimulatoren (Phosphatidylserin, Diolein)

6 - ^{14}C -markierter Molekulargewichtsstandard

**ABB. 34:**

SDS-PAGE 15 % von humanem ^{32}P -Angiogenin (Hoechst, rekombinant aus E. coli und humanem BHK-Angiogenin, rekombinant aus Baby-Hamster-Nierenzellen) nach Phosphorylierung durch PKC unter Benutzung von 1,2-Diolein und 1,3-Diolein als Stimulator der PKC (AUTORADIOGRAMM; Exposition: 24 h).

- # 1 - ^{32}P -Angiogenin (Hoechst) + 1,2-Diolein, Reaktionsansatz ohne PKC
- # 2 - ^{32}P -Angiogenin (Hoechst) + 1,3-Diolein, Reaktionsansatz ohne PKC
- # 3 - ^{32}P -Angiogenin (Hoechst) + 1,2-Diolein
- # 4 - ^{32}P -Angiogenin (Hoechst) + 1,2-Diolein, (PKC in 50 mm Tris-Puffer anstatt Puffer A)
- # 5 - ^{32}P -Angiogenin (Hoechst) + 1,3-Diolein
- # 6 - ^{32}P -Angiogenin (Hoechst) + 1,3-Diolein, (PKC in 50 mm Tris-Puffer anstatt Puffer A)
- # 7 - ^{32}P -Angiogenin (BHK) + 1,2-Diolein
- # 8 - ^{32}P -Angiogenin (BHK) + 1,2-Diolein (PKC in 50 mm Tris-Puffer anstatt Puffer A)
- # 9 - ^{14}C -markierter Molekulargewichtsstandard

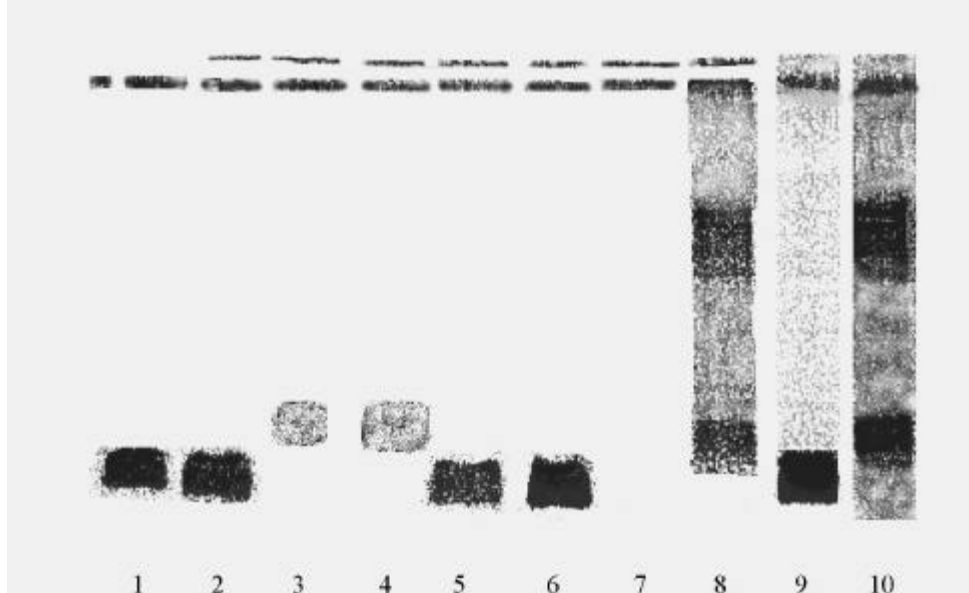


Abb. 35 A

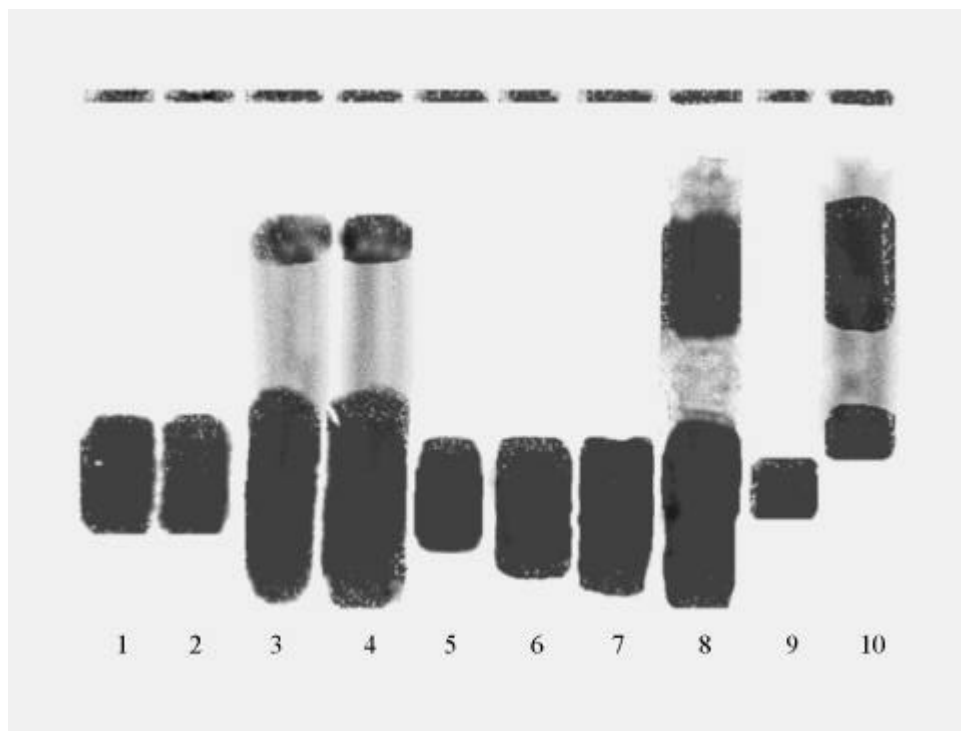


Abb. 35 B

ABB. 35:

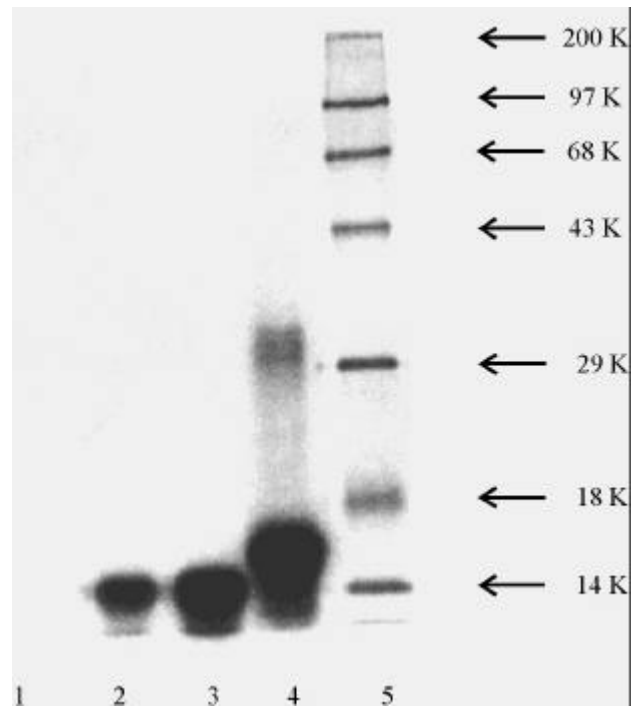
SDS-PAGE 15 % von humanem ^{32}P -Angiogenin und ^{32}P -Histon V S nach Phosphorylierung durch PKC, gereinigt mit SEPHADEX G25 Molekularsiebzentrifugation bei 700 x g über 5 min. bei +4 °C und nach CENTRICON 10 Mikrokonzentration bei 4500 x g über 30 min. bei +4 °C.

A - PROTEINFÄRBUNG mit Coomassie blue

B - AUTORADIOGRAMM (Exposition: 45,5 h)

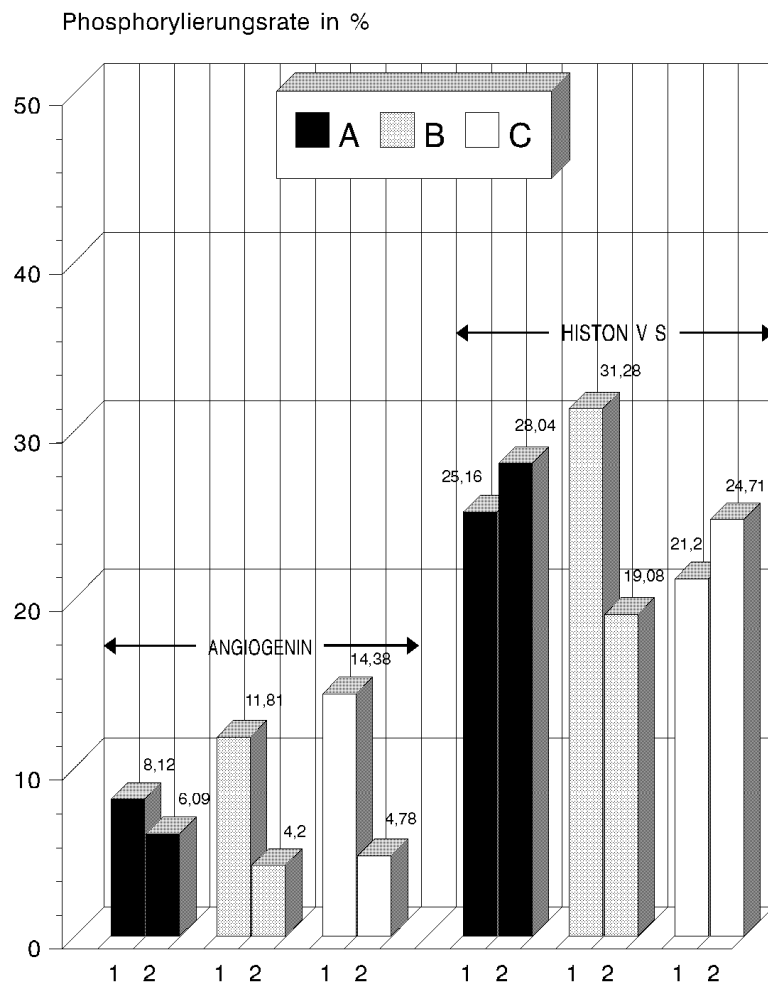
- # 1: ^{32}P -Angiogenin (BHK), 0,2 mg/ml, nach Sephadex G25 Molekularsiebzentrifugation
- # 2: ^{32}P -Angiogenin (Hoechst), 0,2 mg/ml, nach Sephadex G25 Molekularsiebzentrifugation
- # 3 + # 4: ^{32}P -Histon V S, 0,2 mg/ml, Sephadex G25 Molekularsiebzentrifugation
- # 5: ^{32}P -Angiogenin (Hoechst), 0,2 mg/ml, nach Centricon 10 Mikrokonzentration
- # 6: ^{32}P -Angiogenin (BHK), 0,2 mg/ml, nach Centricon 10 Mikrokonzentration
- # 7 + # 8: ^{32}P -Histon V S, 0,2 mg/ml, nach Centricon 10 Mikrokonzentration
- # 9: Natives, unphosphoryliertes Angiogenin (BHK), 0,2 mg/ml
- # 10: Natives, unphosphoryliertes Histon V S, 0,2 mg/ml

Anmerkung: Die Banden # 9 und 10 in ABB. 35B sind nicht radioaktive Proteinbanden nativen Angiogenins, die durch Übereinanderprojektion des Autoradiogramms und des Coomassie Blue gefärbten SDS-Gels zustandekommen und zur Identifizierung der Angiogenin- und Histonbanden dienen.

**ABB. 36:**

SDS-PAGE 15 % von humanem ^{32}P -Angiogenin und ^{32}P -bFGF nach Phosphorylierung durch PKC.
(AUTORADIOGRAMM; Exposition: 20,5 h)

- # 1: ^{32}P -Phosphorylierungsreaktionsansatz plus humanem bFGF 0,25 mg/ml (rekomb. aus E. coli),
aber ohne PKC
- # 2: ^{32}P -Phosphorylierungsreaktionsansatz plus humanem Angiogenin (Hoechst), 0,25 mg/ml
- # 3: ^{32}P -Phosphorylierungsreaktionsansatz plus humanem Angiogenin (Hoechst), 0,50 mg/ml
- # 4: ^{32}P -Phosphorylierungsreaktionsansatz plus humanem bFGF 0,25 mg/ml (rekomb. aus E. coli)
- # 5: ^{14}C -markierter Molekulargewichtsstandard



A: SDS-PAGE 15%, B: SDS-PAGE 15% nach Centricon 10 Zentrifugation,
C: Säurepräzipitation auf Filterpapier nach Centricon 10 Zentrifugation

ABB. 37:

Phosphorylierungsrate von Angiogenin und Histon V S durch PKC nach unterschiedlicher Fraktionierung **A** - SDS-PAGE 15 % **B** - SDS-PAGE 15 % nach Centricon 10 Mikrokonzentrator-Zentrifugation (4500 g, 30 min.) **C** - Säurepräzipitation auf Filterpapier nach Centricon 10 Mikrokonzentrator-Zentrifugation (4500 g, 30 min.) **1** - Reaktion Laemmli-Puffer gestoppt; **2** - Reaktion Eisessig/100 mm EGTA gestoppt

**Direkte Messung der Proteinphosphorylierung nach
Centricon 10 bzw. Sephadex G-25 Zentrifugation**
³²P-Phosphorylierung von ANG und bFGF mit PKC

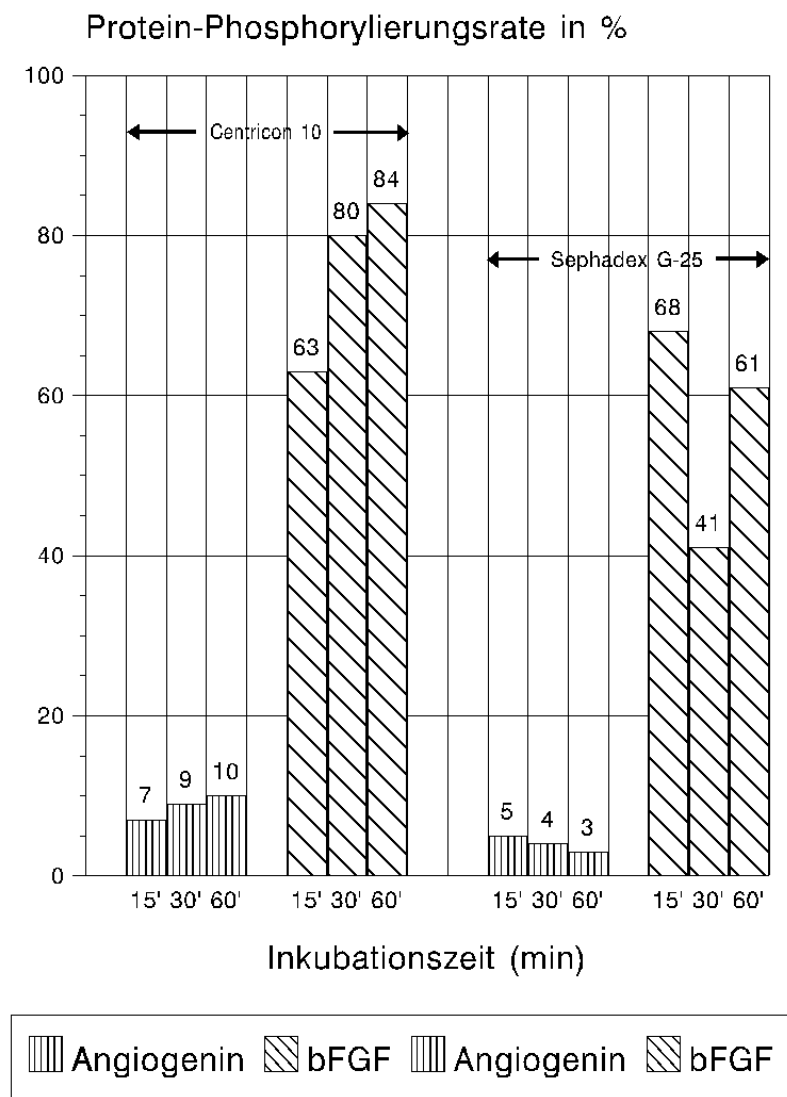


ABB. 38:

³²P-Phosphorylierungsrate von Angiogenin und bFGF durch PKC in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Konzentrierung und Reinigung durch Centricon 10 Mikrokonzentratoren- bzw. Sephadex G-25 Zentrifugation.

Kinetik der Phosphorylierung von Histon V S mit PKC bei verschiedenen Substratkonzentrationen

(PKC-Konzentration $2,5 \mu\text{g/ml} = 31,25 \text{ nM}$)

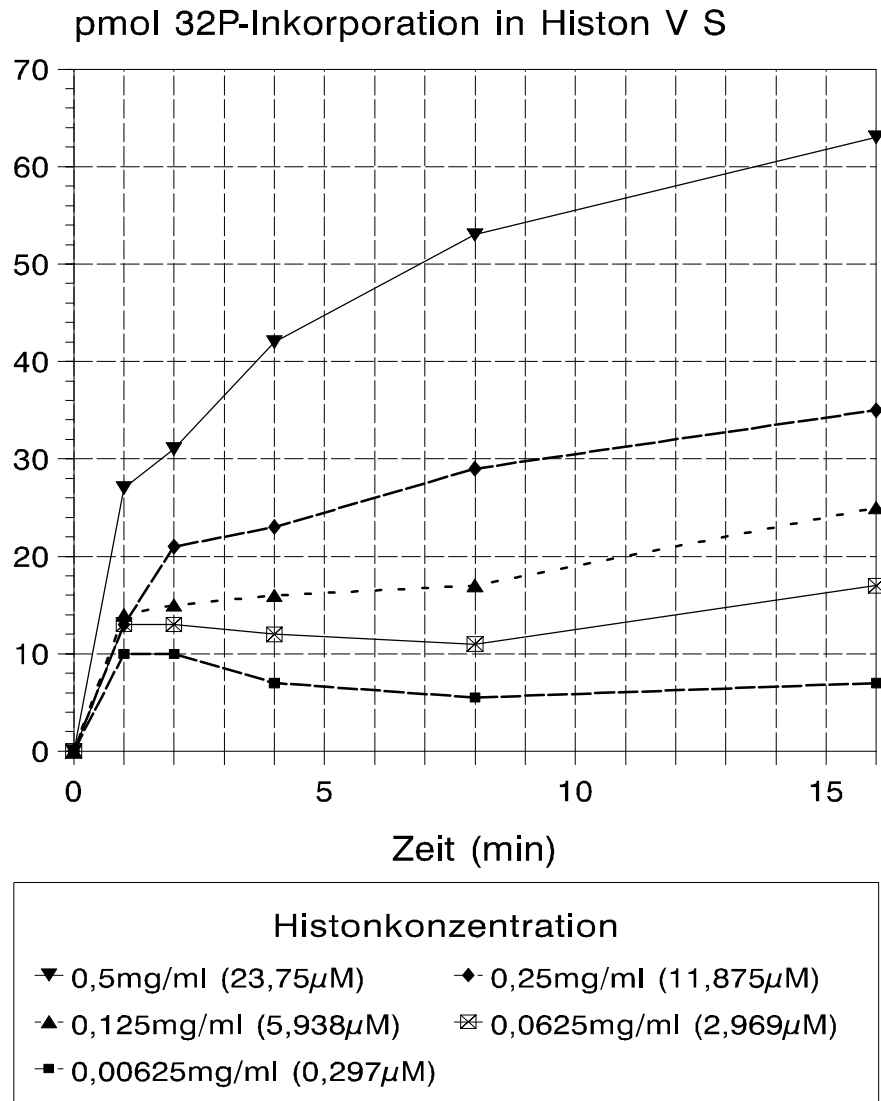
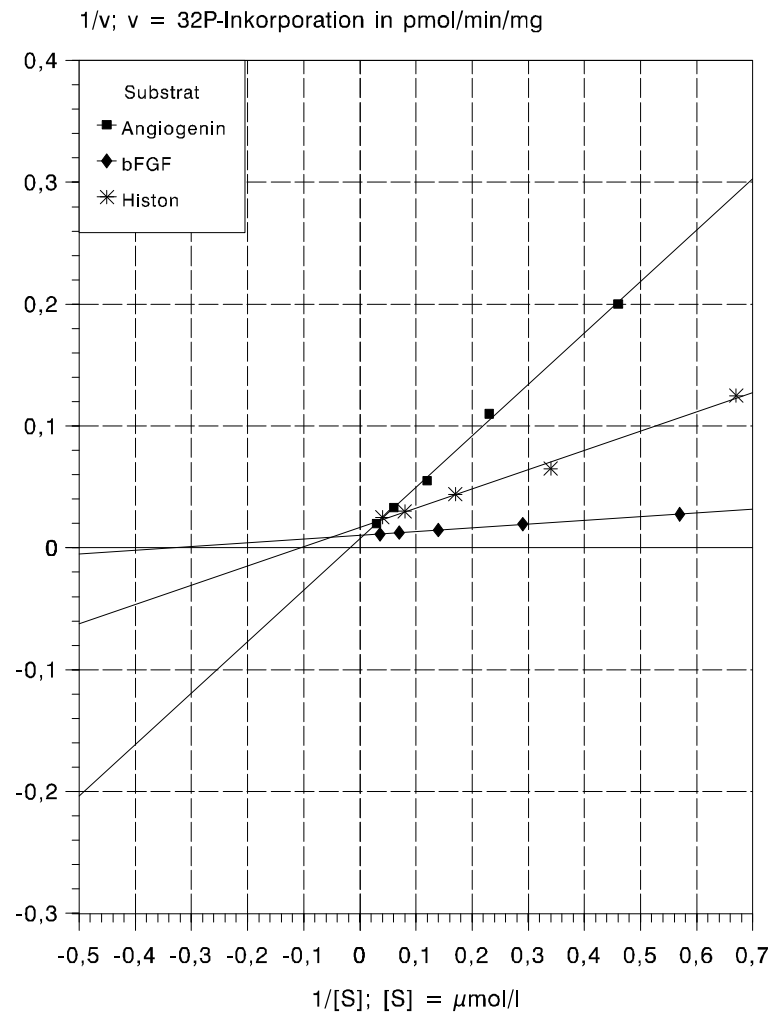


ABB. 39:

Zeitkinetik der Phosphorylierung von Histon V S durch PKC bei verschiedenen Substratkonzentrationen. Angabe der Phosphorylierung als Einbau von ^{32}P in Histon. Die PKC-Konzentration im Reaktionsansatz war 31,25 nM.

Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration
bei der Phosphorylierung von Angiogenin, bFGF und Histon V S durch PKC
Lineweaver-Burk-Diagramm zur Ermittlung der Michaelis-Konstanten



[S] = Substratkonzentration, v = Reaktionsgeschwindigkeit
PKC-Konzentration = 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (31,25 nM)

ABB. 40:

Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration bei der Phosphorylierung von Angiogenin, bFGF und Histon V S durch PKC. Doppelt reziproke Darstellung nach Lineweaver-Burk zur graphischen Ermittlung der Michaelis-Konstanten.

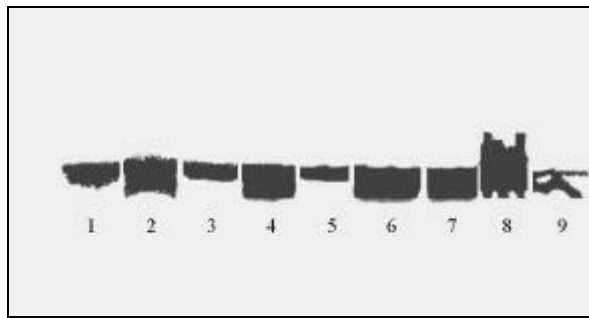


Abb. 41 A I

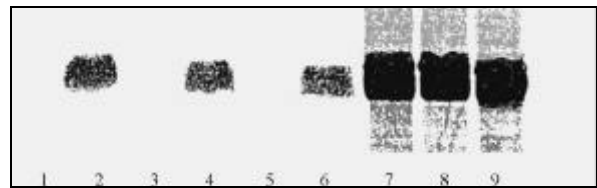


Abb. 41 A II

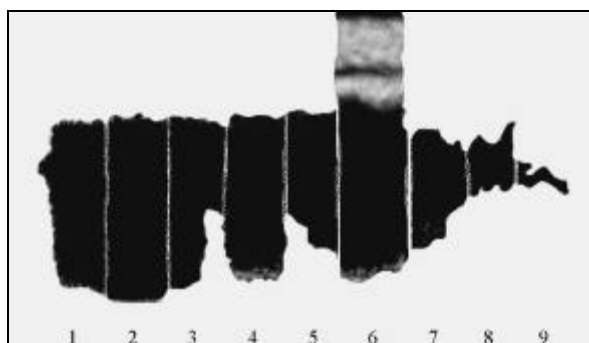


Abb. 41 B I

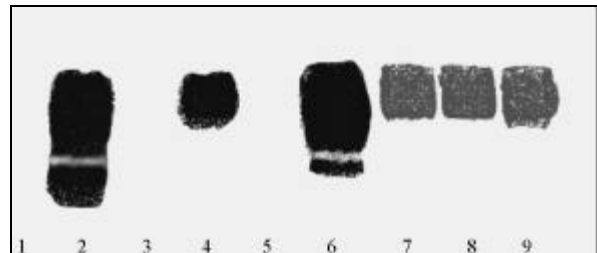


Abb. 41 B II

ABB. 41:

SDS-Gelelektrophorese 15 % zum Nachweis der Effektivität der CENTRICON 10 Membranfilterzentrifugation bei 4500 g über 30 min. bei +4° C zur Elimination überschüssigen radioaktiven Phosphors von ^{32}P -Angiogenin nach Phosphorylierung durch PKC.

A - PROTEINFÄRBUNG mit Coomassie Blue:

- (I) - vor CENTRICON 10 Membranfilterzentrifugation,
- (II) - nach CENTRICON 10 Membranfilterzentrifugation.

B - AUTORADIOGRAMM (Exposition: 25,5 h):

- (I) - vor CENTRICON 10 Membranfilterzentrifugation,
- (II) - nach CENTRICON 10 Membranfilterzentrifugation.

- | | | |
|-------|-------------------------------------|--|
| # 1 - | 0,1 mg/ml hANG (Hoechst, batch I), | Reaktionszeit: 15 min. |
| # 2 - | 1,0 mg/ml hANG (Hoechst, batch I), | Reaktionszeit: 60 min. |
| # 3 - | 0,1 mg/ml hANG (Hoechst, batch II), | Reaktionszeit: 15 min. |
| # 4 - | 1,0 mg/ml hANG (Hoechst, batch II), | Reaktionszeit: 60 min. |
| # 5 - | 0,1 mg/ml BHK-hANG, | Reaktionszeit: 15 min. |
| # 6 - | 1,0 mg/ml BHK-hANG, | Reaktionszeit: 60 min. |
| # 7 - | 1,0 mg/ml hANG (Hoechst, batch I), | Reaktionszeit: 60 min., Inkubation <u>ohne</u> PKC |
| # 8 - | 1,0 mg/ml hANG (Hoechst, batch II), | Reaktionszeit: 60 min., Inkubation <u>ohne</u> PKC |
| # 9 - | 1,0 mg/ml BHK-hANG, | Reaktionszeit: 60 min., Inkubation <u>ohne</u> PKC |

Anmerkung: Die Banden # 7, 8 und 9 in ABB. 41B(II) sind nicht radioaktive Proteinbanden nativen Angiogenins (Reaktion ohne PKC), die durch Übereinanderprojektion des Autoradiogramms und des Coomassie Blue gefärbten SDS-Gels zustandekommen und zur Identifizierung der Angiogeninbanden dienen.

Zeitkinetik und Pufferspezifität der Proteinphosphorylierung mit PKC
 32P-Phosphorylierung von humanem ANGIOGENIN und HISTON V S
 (Säurepräzipitation auf Filterpapier)

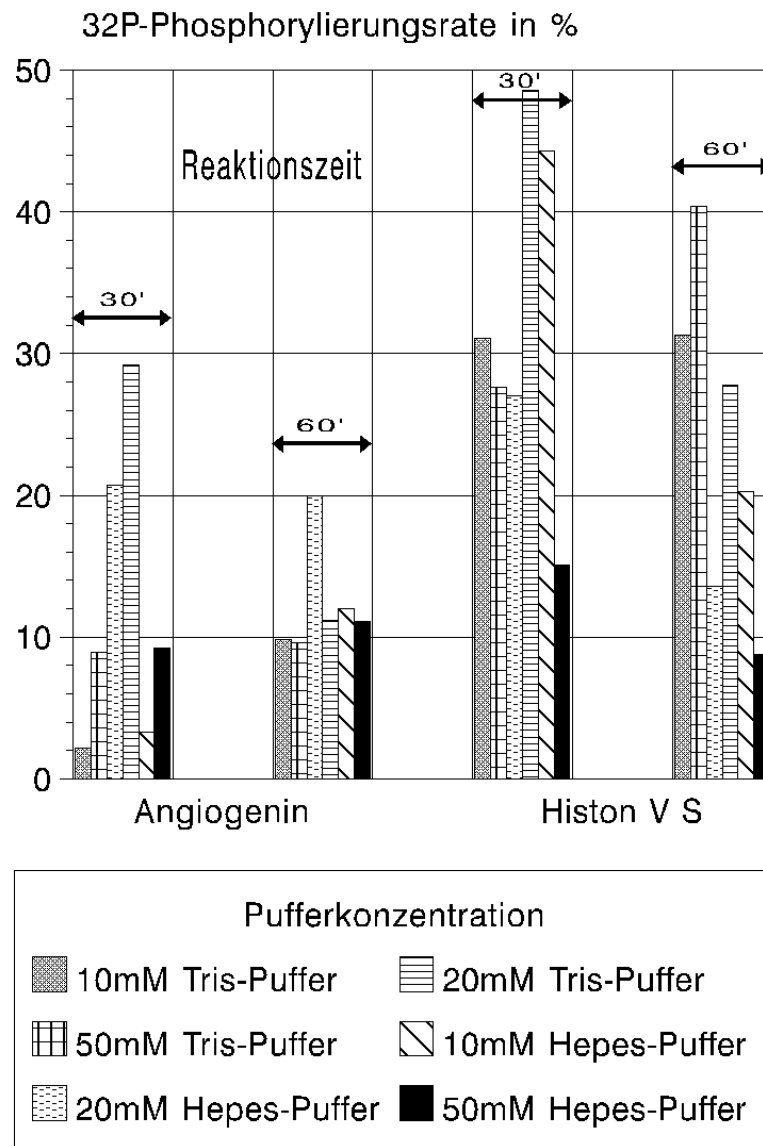


ABB. 42:

Zeitkinetik und Pufferspezifität der Phosphorylierung von Angiogenin und Histon V S durch PKC. Reinigung der phosphorylierten Proteine durch Säurefällung.

Phosphorylierung von humanem ANGIOGENIN mit PKC
Phosphorylierungsgrad nach verschiedenen Reinigungsschritten
(Reaktionszeit: 30 Minuten)

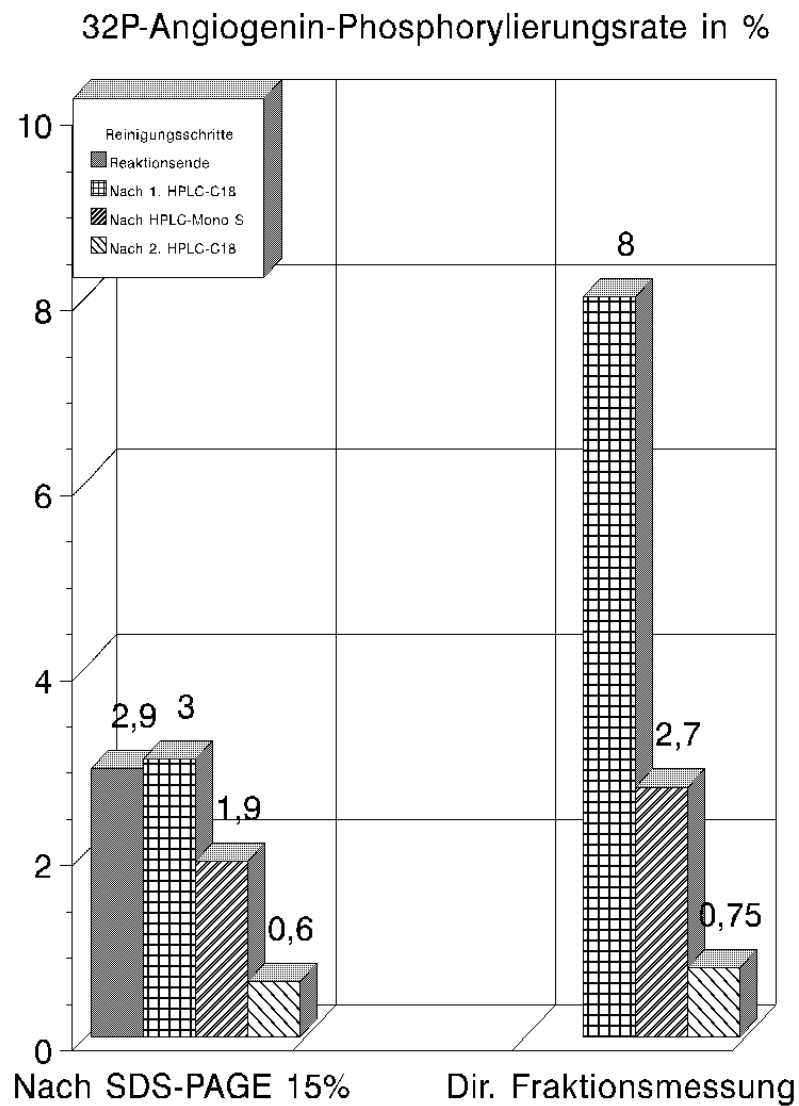


ABB. 43:

Einfluß der Reinigungsschritte auf den Ertrag an 32P-Angiogenin nach Phosphorylierung durch PKC.

10. ANHANG 2:

Detaillierte Auflistung von Material und Methoden zur Phosphorylierung von Proteinen durch PKC

10.1 Phosphorylierungsreaktion

10.1.1 Materialien

Proteinkinase C (PKC) 100 µg/ml in Puffer A (Standardlösung), (Lagerung bei -70° C), MG ~80.000, isoliert und gereinigt aus Rattengehirn nach einer Methode von Walton et al. (1987) [Isolierung durchgeführt von Toru Takeuchi].

Humanes Angiogenin (hANG) 2,74 mg/ml in H₂O von Hoechst (~95–99 % rein), hergestellt von rekombinanten E. coli Zellen (Batch I), MG 14.400 (Lagerung bei +4° C).

Humanes Angiogenin (hANG) 3,8 mg/ml in H₂O von Hoechst (~95–99 % rein), hergestellt von rekombinanten E. coli Zellen (Batch II), MG 14.400 (Lagerung bei +4° C).

Humanes Angiogenin hergestellt von rekombinanten Baby-Hamster-Nierenzellen (BHK-hANG) 1,8 mg/ml in H₂O (99 % rein), MG 14.400 (Lagerung bei +4° C).

ATP von Boehringer als Di-Natriumsalz (84 % rein), MG 605,2 (Lagerung bei +4° C).

(γ-³²P)ATP von NEN in Tricin-Puffer, MG 912, 3000 Ci/mmol = 10 mCi/ml; 1 µl ~ 2–2,5x10⁷ IPM, Halbwertszeit: 14,3 Tage (Lagerung bei -70° C).

Phosphatidylserin von SIGMA 10 mg/ml in 95 % Chloroform und 5 % Methanol (Lagerung bei -20° C)

Diolein-(1–3) von SIGMA 5 mg gelöst in 1,25 ml Chloroform = 4 mg/ml, (Lagerung bei -70° C)

1,2-Dioctanoyl-rac-Glyzerin [Diolein-(1–2)] von SIGMA 5mg gelöst in 1,25 ml Chloroform = 4 mg/ml, (Lagerung bei -70° C), FG 344,5 (C₁₉H₃₆O₅), ~98 % rein

Histon V-S, reich an Lysin von SIGMA, MG ~21.000, 2 mg/ml in H₂O (Lagerung bei +4° C)

Humaner basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (hbFGF) hergestellt aus rekombinanten E. coli Zellen von R&D, MG 18.000, 25 µg steril lyophilisiert aus 10mM Tris-HCl pH 7,0 (Lagerung bei -70° C)

50 mM Tris-HCl pH 7,5; MG 121,1 (Lagerung bei +4° C)

1 M MgCl_2

100 mM CaCl_2

100 mM EDTA

100 mM EGTA

Glyzerin

DTT

Triton X-100

8,5 % NaCl (1,45 M)

Eisessig 99,9 %, MG 60,05

10.1.2 Reagenzien

Puffer:	Puffer A (Lagerung bei -70°C)	20 mM Tris-HCl (pH 7,5) 2 mM EDTA 2 mM EGTA 1 mM DTT 1 M NaCl 16 % Glyzerin 0,02 % Triton X-100
	Puffer B	27 mM Tris-HCl (pH 7,5) 14 mM MgCl_2 2,5 mM CaCl_2
	Puffer C	27 mM Tris-HCl (pH 7,5) 14 mM MgCl_2

PKC Arbeitslösung I – PKC Standardlösung 15x verdünnt in Puffer A

PKC Arbeitslösung II – PKC Standardlösung 15x verdünnt in 50 mM Tris-HCl (pH 7,5)

ATP Arbeitslösung spezifische Aktivität 346 IPM/pmol

Präparation:	1. ($\gamma\text{-}^{32}\text{P}$)ATP	->	003 μl \Leftrightarrow 5,1 pmol (= $2,77 \times 10^7$ IPM)
	2. 2,1 mM ATP	->	008 μl \Leftrightarrow 80 nmol
	3. Puffer B	->	<u>114 μl</u>
			125 μl 0,64 mM ATP in Puffer B

Aktuelle Aktivität:

1 µl (γ - ^{32}P)ATP = 5 µCi/µl am Herstellungstag (= spezifische Aktivität am Kalibrierungsdatum). Die aktuelle spezifische Tagesaktivität abgelesen aus der Zerfallstabelle beträgt: 78,5 %.

Die Bestimmung der aktuellen spezifischen Tagesaktivität läßt sich allgemein nach der folgenden Formel berechnen:

Formel zur Berechnung der aktuellen spezifischen Tagesaktivität ASA von ^{32}P -Phosphor:

$$ASA = \frac{D_F}{\frac{1}{SA_{cal}} - \frac{[1 - D_F]}{9120}} \quad (\text{Formel 3})$$

D_F = Zerfallskonstante; SA_{cal} = Spezifische Aktivität am Kalibrierungstag des Herstellers; 9120 = Theoretische spezifische Aktivität freien ^{32}P .

Herstellung einer 1:10 Verdünnung: 1 µl (γ - ^{32}P)ATP + 9 µl Puffer B \Rightarrow

1 µl der 1:10 Verdünnung + 2 ml Hydrofloor^R werden in einem Flüssigkeits-Szintillations-Probenröhrchen gemessen:

921776,0 IPM/0,17 pmol (γ - ^{32}P)ATP \Leftrightarrow 5,42x10⁶ IPM/pmol (γ - ^{32}P)ATP

\Leftrightarrow 9,22x10⁶ IPM/µl (γ - ^{32}P)ATP

Stimulator A (Präparation in Glas-Reagenzröhrchen)

10 µl Phosphatidylserin

2,5 µl 1,2-Dioctanoyl-rac-Glyzerin

5–10 min. getrocknet unter N₂, anschließend 0,5 ml Puffer C hinzugefügt. Sonifikation mit der Mikro-Spitze über 1 min. mit niedriger Intensität (Stufe 1–2).

Stimulator I (Präparation im Glas-Reagenzröhrchen)

10 µl Phosphatidylserin

2,5 µl 1,3-Diolein

5–10 min. getrocknet unter N₂, anschließend 0,5 ml Puffer C hinzugefügt. Sonifikation mit der Mikro-Spitze über 1 min. mit niedriger Intensität (Stufe 1–2).

Angiogenin (Hoechst) Arbeitslösung

Verdünnte Angiogenin (Hoechst) Standardlösung 2,74 mg/ml mit H₂O auf 1 mg/ml

Angiogenin (BHK) Arbeitslösung

Verdünnte Angiogenin (BHK) Standardlösung 1,8 mg/ml mit H₂O auf 1 mg/ml

Histon V-S Arbeitslösung

Verdünnter Standard 2 mg/ml mit H₂O auf 1 mg/ml

bFGF Arbeitslösung

0,1 mg/ml hbFGF gelöst in sterilem 0,2 % Rinderserumalbumin in PBS

10 mM EGTA

10 % Essigsäure

LAEMMLI-Puffer 2x von SIGMA

4 % SDS, 20 % Glycerin, 10 % β -Mercapto-Äthanol, 0,125 M Tris HCl pH 6,8

10.1.3 Ausführung**Phosphorylierungsreaktion:**

Nach Mischen, Inkubation für 30 min. bei 30° C:

1 Volumenanteil Stimulator

1 Volumenanteil PKC Arbeitslösung

1 Volumenanteil Arbeitslösung Substrat (ANG, bFGF od. Histon)

1 Volumenanteil ATP Arbeitslösung

Stoppen der Reaktion durch Hinzufügen von: 0,4x Gesamtvolumen EGTA 10 mM + 0,06x Gesamtvolumen Eisessig 99,9 % oder alternativ 0,4x Gesamtvolumen LAEMMLI-Puffer 2x.

10.2 C18-HPLC**10.2.1 Materialien**

C18-HPLC Säule von PHARMACIA

HPLC-Gerät (Probenapplikator, Pumpe, Photometer, Fraktionssammler) von PHARMACIA

Trifluor-Essigsäure (TFA), MG 114, C₂HF₃O₂ von SIGMA

Propanol (HPLC rein) von SIGMA

Azetonitril (Methylcyanid), MG 41,05, C₂H₃N, (HPLC rein) von SIGMA

10.2.2 Reagenzien

Lsg. A für C18-HPLC

0,1 % TFA

Lsg. B für C18-HPLC

Azetonitril : Propanol : Wasser = 3 : 2 : 2 + 0,08 % TFA

10.2.3 Ausführung

Äquilibrierung der Säule mit 70 % Lsg. A und 30 % Lsg. B, Messung der O.D. bei 280 nm. Nach Injektion der Probe Elution mit einem linearen Gradienten von 70 % Lsg. A und 30 % Lsg. B bis zu 50 % Lsg. A und 50 % Lsg. B über 60 min. bei einer Flußrate von 0,8 ml/min. Das Eluat wird in Fraktionen pro Minute gesammelt und auf Radioaktivität (Inkorporation von γ -³²P in IPM) in einem Flüssigkeits-Szintillations-Meßgerät (20 µl jeder Fraktion + 2 ml Hydrofloor^R gemessen 1 min.) untersucht. Zur Konzentrierung und Volumenreduktion der eluierten Fraktionen wurde vor erneuter HPLC-Fraktionierung oder SDS-Gelelektrophorese eine SEPHADEX G25 Molekularsiebsäulenzentrifugation oder eine CENTRICON 10 Membranfilterzentrifugation angeschlossen.

10.3 Mono S-HPLC

10.3.1 Materialien

Mono S-HPLC Säule von PHARMACIA

HPLC-Gerät (Probenapplikator, Pumpe, Photometer, Fraktionssammler) von PHARMACIA

50 mM Tris-HCl pH 8,0; MG 121,1 (Lagerung bei +4° C)

8,5 % NaCl (1,45 M)

10.3.2 Reagenzien

Lsg. A' für Mono S-HPLC

10 mM Tris-HCl (pH 8,0)

Lsg. B' für Mono S-HPLC

10 mM Tris-HCl (pH 8,0)

1,0 M NaCl

10.3.3 Ausführung

Äquilibrierung der Säule mit 85 % Lsg. A' und 15 % Lsg. B', Messung der O.D. bei 254 nm.

Die C18-HPLC Fraktionen werden mit 2 M Tris-HCl auf einen pH von 8,0 eingestellt.

Nach Injektion der Probe Elution mit einem linearen Gradienten von 85 % Lsg. A' und 15 % Lsg. B' zu 45 % Lsg. A' und 55 % Lsg. B' über 50 min. bei einer Flußrate von 0,8 ml/min. Das Eluat wird in Fraktionen pro Minute gesammelt und auf Radioaktivität (Inkorporation von γ -³²P in IPM) in einem Flüssigkeits-Szintillations-Meßgerät (20 µl jeder Fraktion + 2 ml Hydrofloor^R, Meßzeit: 1 min.) untersucht. Zur Konzentrierung und Volumenreduktion der eluierten Fraktionen wurde vor erneuter HPLC-Fraktionierung oder SDS-Gelelektrophorese eine SEPHADEX G25 Molekularsiebsäulenzentrifugation oder eine CENTRICON 10 Membranfilterzentrifugation durchgeführt.

10.4 Saure Proteinfällung

10.4.1 Materialien

BIORAD Filterpapier Nr. 165-0921

100 % Trichlor-Essigsäure (TCA), $C_2HCl_3O_2$, FG 163,39, von FISHER SCIENTIFIC

200 mM Natrium-Pyrophosphat $Na_4P_2O_7 \times 10 H_2O$, FG 446,06

100 % Äthanol (Äthyl-Alkohol) abs. 200 proof, AAPER Alcohol & Chem. Corp.

10.4.2 Ausführung

- a) Zeichne ein Gitternetz von 2x2 cm großen Quadraten auf das Filterpapier.
- b) Lege das Filterpapier auf eine saubere Glasplatte.
- c) Pipettiere 50 μ l von jeder Probe (phosphoryliertem Protein) jeweils in das Zentrum eines der 2x2 cm messenden Quadrate.
- d) Wasche das Blatt Filterpapier 4x mit jeweils 250 ml 10 %-iger TCA, die 10 mM Natrium-Pyrophosphat enthält für 10–15 min.
- e) Wiederhole den Waschvorgang 2x mit jeweils 100 ml Äthanol 100 % über 10–20 min.
- f) Trockne das Filterpapier unter einer Wärmelampe für 30 min.
- g) Schneide die 2x2 cm messenden Quadrate aus.
- h) Platziere die Papierquadrate jeweils in ein Flüssigkeits-Szintillationsmeßgefäß.
- i) Füge jeweils 5 ml Econofloor^R hinzu und messe die Aktivität in einem Flüssigkeits-Szintillationsmeßgerät.

10.5 SEPHADEX G25 Molekularsiebsäulenzentrifugation

10.5.1 Materialien

SEPHADEX G25 (fein) von PHARMACIA, 2–3 h aufgequollen in 20 mM Tris-HCl pH 7,5 und aufgeschwemmt bei +4 ° C gelagert.

Blaue Eppendorf-Mikro-Pipettenspitzen (Vol. 1 ml)

Glaswolle

Chem tubes (Polypropylen) + Verschlußkappen (Vol. 3 ml)

Glas-Reagenzröhrchen (Vol. 5 ml)

Rinderserumalbumin (RSA) 0,4 % (SIGMA) in 20 mM Tris-HCl pH 7,5

10.5.2 Ausführung (modifiziert nach einer Methode von Soo-Ik Chang)

- a) Schneide die Chem tube Verschlußkappen so aus, daß die blauen 1 ml Mikro-Pipettenspitzen in die Verschlußkappen eingesetzt werden können.

- b) Bringe etwas Glaswolle in die Pipettenspitze und setze die präparierten Pipettenspitzen in die Glas-Reagenzröhrchen.
- c) Fülle 1,0–1,5 ml aufgequollenes SEPHADEX G25 in die Pipettenspitzen.
- d) Zentrifugiere bei 700–1200 x g für 3–5 min bei +4° C, um freie Flüssigkeit aus der Minisäule zu entfernen. (Zentrifuge: Sorvall Kühlzentrifuge, Rotor 269, Radius r = 26,9 cm bei N = 1500–2000 Upm, gemäß der Formel:

Formel zur Berechnung der Zentrifugalkraft RCF in g:

$$\text{RCF (x g)} = 1,118 \times 10^{-5} \times r \times N^2 \quad (\text{Formel 4})$$

r = Radius; N = Umdrehungszahl Upm

- e) Stanze ein kleines Entlüftungsloch in jede Chem tube nahe dem oberen Rand.
- f) Setze die SEPHADEX G25 gefüllten Pipettenspitzen in die Chem tubes.
- g) Trage maximal 100–120 µl Probenvolumen (phosphoryliertes Protein), dem 0,4 % RSA als Stabilisator und Trägerprotein zugesetzt wurden, auf (nicht mehr als ca. 10 % des SEPHADEX G25 Säulenvolumens).
- h) Zentrifugiere erneut wie unter d) beschrieben. (Niedermolekulare Verunreinigungen und freies (γ -³²P)ATP bleiben in der Minisäule hängen.)
- i) Sammle und bewahre das Filtrat ~90–110 µl (ca. 10 % Probenvolumenverlust).

10.6 CENTRICON 10 Membranfilterzentrifugation

10.6.1 Materialien

Centricon-10 Mikrokonzentrations-Röhrchen
Kühlzentrifuge

10.6.2 Reagenzien

Essigsäure-EGTA-Lsg.
0,1 M Essigsäure
2 mM EGTA

10.6.3 Ausführung

Konzentrierung der Phosphorylierungsprodukte und Separation von freiem (γ -³²P)ATP:

1. Pipettiere jede Probe in ein Centricon-10 Mikro-Konzentrationsröhrchen und zentrifugiere 20 min. bei 4500 x g.

2. Wiederhole den vorherigen Schritt jeweils nach Hinzufügen von 1,0 ml Essigsäure-EGTA-Lsg. 2x.
3. Zentrifugiere jede Probe invertiert für 2 min. bei 500 x g. Das gesammelte Konzentrat wird bei +4° C für weitere Analysen aufbewahrt.

10.7 SDS-PAGE

10.7.1 Materialien und Reagenzien

Äthanol 95%

Methanol

Acrylamid von BIORAD

Methylenbisacrylamid (BIS), MG 154,17 von BIORAD

Tris-Base, MG 121,1

Glycin, MG 75,1 von SIGMA

Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS), MG 288,38 von BIORAD

β-Mercapto-Äthanol

Bromphenol blau 0,1 %, MG 669,98, kristallin von AMES

Glyzerin von SIGMA

Ammoniumpersulfat, MG 228,20 von BIORAD

NNN'N'-Tetramethylendiamin (TEMED), 6,6 M, MG 116,21 von BIORAD

¹⁴C-markierte Protein-Molekulargewichts-Standards von BETHESDA RESEARCH LAB. (BRL):

1. Lysozym	14300
2. β-Lactoglobulin	18400
3. Carboanhydrase	29000
4. Ei-Albumin	43000
5. Rinderserumalbumin	68000
6. Phosphorylase B	97400
7. Myosin (H-chain)	200000

¹⁴C-markierter niedermolekularer Protein-Molekulargewichts-Standard von BETHESDA RESEARCH LAB. (BRL):

1. Insulin, A-Kette	2300
2. Insulin, B-Kette	3400
3. Trypsin Inhibitor (Rind)	6200
4. Lysozym	14300
5. β-Laktoglobulin	18400
6. Carboanhydrase	29000
7. Ei-Albumin	43000

Eisessig 99,9 %, MG 60,05 von SIGMA

5-Schwefel-Salizylsäure von SIGMA

10.7.2 Arbeitslösungen

Acrylamid-Bis 30g Acrylamid (30 %)
 0,8g Bis (0,8 %)
 ad 100 ml H₂O (Lagerung bei +4° C in brauner Flasche)

Trennpuffer (lower Tris) 4x 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
0.4 % SDS

Auftragungspuffer (upper Tris) 4x 0,5 M Tris-HCl pH 6,8
0,4 % SDS

Entfärbelösung 10 % Äthanol
 7,5 % Essigsäure

Polyacrylamid-Stabilisierungslösung
2 %Glycerin
12 %TCA
3,5 % 5-Schwefel-Salizylsäure

Elektrodenpuffer 4x (Reservoirpuffer)	0,1 M Tris, pH 8,4 0,8 M Glyzin 0,1 % SDS
---------------------------------------	---

Probenpuffer 1x	10 % Glycerin
	5 % β -Mercapto-Äthanol
	3 % SDS
	0,0625 M Tris-HCl pH 6,8
	0,002 % Bromphenol blau

Ammoniumpersulfat-Lösung 10 % (tgl. frisch herstellen)

SDS-Lösung 10 %

Färbelösung nach Westerberg	150 ml Methanol
	372 ml aqua dest.
	60 g TCA
	0,5 g Coomassie blue
	18 g 5-Schwefel-Salizylsäure

10.7.3 Ausführung

Gelpräparation:

Trenn-Gel (lower gel): 12,5 % Vermische in einem Glasgefäß:
6,25 ml Acrylamid-Bis-Lösung
3,75 ml Trennpuffer (lower Tris) 4x
5,00 ml aqua dest.
100 µl Ammoniumpersulfat-Lösung 10 %
6,65 µl TEMED 6,6 M

Das Trenn-Gel wird sofort in die vorbereitete Gelkammer einpipettiert unter Vermeidung von Luftblasen. Aufpipettieren einer Lage aqua dest. oder Methanol (~2 ml) zur Abdeckung der Oberkante des polymerisierenden Gels (Vermeidung von Luftkontamination). Zugleich Aufbringen des Probenkammes.

Auftragungs-Gel (upper gel): 6 % Vermische in einem Glasgefäß:
2,0 ml Acrylamid-Bis-Lösung
2,5 ml Auftragungspuffer (upper Tris) 4x
5,4 ml aqua dest.
0,1 ml Ammoniumpersulfat-Lösung 10 %
5 µl TEMED 6,6 M

Nach der Polymerisation des Trenn-Gels erfolgt das Abgießen des aqua dest od. des Methanols. Spülen der Geloberkante mit 1–2 ml Auftragungs-Gellösung ohne TEMED. Anschließend wird der Probenkamm wieder aufgesetzt und das Auftragungs-Gel vom Rand her unter Vermeidung von Blasenbildung einpipettiert. Nach der Polymerisation des Auftragungs-Gels wird der Probenkamm vorsichtig entfernt und mit Elektrodenpuffer gespült.

Probenvorbereitung:

Zu jeder Probe von 5 µl Volumen werden 2,5 µl Probenpuffer hinzugefügt und in einem Eppendorf-Mikro-Reaktionsgefäß 10 min. in kochendem Wasserbad inkubiert.

Elektrophorese:

Nach der Herstellung von 1500 ml Elektrodenpuffer 1x wird die Gelbox in die Elektrophoresekammer gestellt und mit ca. 300 ml Elektrodenpuffer aufgefüllt. Der restliche Elektrodenpuffer wird in die Elektrophoresekammer eingefüllt unter Vermeidung von Luftblasen unter der Gelbox.

Pro vorhandene Kammvertiefung im Auftragungsgel werden 7,5 µl vorbereitete Probe mit einer feinen Pipette unter Vermeidung von Turbulenzen einpipettiert. Danach wird die Elektrophorese gestartet (applizierte Spannung: 300 V, Stromstärke: 40 mA, Zeitdauer: 2–3 h). Die Elektrophorese wird gestoppt, wenn der Probenfarbstoff nahe dem Boden der Gelbox angekommen ist.

Proteinfärbung:

Nach Entnahme des Gels aus der Elektrophorese-Kammer erfolgt die Färbung und Fixierung der Proteine im Gel nach Westerberg bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln über Nacht. Danach Entfernen der überschüssigen Westerberglösung durch Einlegen des Gels in eine Entfärbelösung unter leichtem Schaukeln für 2–3 h. Anschließend wird das Gel um ein Schrumpfen und Brüchigwerden während des Trocknungsvorganges zu verhindern 30–60 min. in eine Stabilisierungslösung gelegt. Zum Trocknen wird das Gel auf Löschpapier gelegt und in einem speziellen Gel Trocknungsapparat 2 h bei 80° C unter Vakuum getrocknet.

Autoradiographie:

Das getrocknete Gel wird in der Dunkelkammer zusammen mit einem Kodak Diagnostik Röntgenfilm X-OMAT™ AR 8x10 inch in eine Expositionskassette gebracht und 24 h bei –70° C exponiert. Nach einer Aufwärmphase von 1–2 h zur Verhinderung der Kondenswasserbildung erfolgt die Entwicklung in der Entwicklungsmaschine.

Auf dem Leuchttisch unter Lupenvergrößerung werden die Proteinbanden aus dem fixierten Gel herausgeschnitten und mit 2 ml Hydrofloor^R in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler gemessen.

10.8 Messung der ³²P-Aktivität

³²P-aktive Proben werden entweder in 2 ml Hydrofloor^R oder 2–5 ml Econofloor^R in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler (Micromedic 4/600 plus Automatic γ Counter) als Impulse/min. (IPM) gemessen (Meßzeit 1–5 min.).

10.9 Berechnung der ³²P-Aktivität

Die Berechnung der Phosphorylierung des Substrates durch die PKC erfolgt über Messung des ³²P-Einbaus in das Substrat nach der Formel:

Formel zur Berechnung der Substratphosphorylierung über den Einbau von ^{32}P -Phosphor:

$$E = \frac{Z \times Vf \times Vol \times Zk}{SA} \quad (\text{Formel 5})$$

E = ^{32}P -Inkorporation (pmol)

Z = gemessene Zerfälle (IPM)

Vf = Verdünnungsfaktor

Vol = Fraktionsvolumen (μl)

Zk = Zerfallskonstante

SA = Spezifische Aktivität (IPM \times pmol^{-1})

11. ANMERKUNGEN UND DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde partiell unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und aus Mitteln des chirurgischen Forschungsfonds des Brigham & Womens Hospitals Boston, sowie von der Hoechst AG in Zusammenarbeit mit der Harvard University in Boston.

Für die Mithilfe bei der Anfertigung und Auswertung der mikroskopischen Schnitte und der Präparate im Abschnitt 4.3 wird Frau cand. med. Doris Fuhrmann und Frau Dr. Anke Fahrenkamp aus dem Pathologischen Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster gedankt.

Für die Bereitstellung technischer Assistenz, sowie für wertvolle Hinweise bei der Anfertigung und Auswertung der mikroskopischen Präparate für die Versuche im Abschnitt 4.4 gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. F. Schoen, Department of Cardiology Pathology, Brigham & Womens Hospital, Harvard University Boston.

Bei der Durchführung aller Tierversuche danke ich Herrn Janusz Weremowicz, Center for Biochemical and Biophysical Sciences and Medicine, Harvard University Boston für seine Assistenz.

Für die herzliche Aufnahme und schnelle Integration, sowie die Unterstützung meiner Forschungsaktivitäten mit Rat und Tat bin ich zu besonderem Dank verpflichtet Herrn Prof. Dr. Bert L. Vallee und Herrn Prof. Dr. James Riordan, Center for Biochemical and Biophysical Sciences and Medicine, Harvard University Boston und Herrn Prof. Dr. John Collins, Department of Cardiac Surgery, Brigham & Womens Hospital, Harvard University Boston.

12. CURRICULUM VITAE

Horst Rudolf Laube, geb. 1952 in Frankfurt am Main

1971 Abitur in Frankfurt am Main

1971–1977 Studium der Medizin an der J.W. Goethe-Universität in Frankfurt am Main

1977 Staatsexamen und Approbation in Frankfurt am Main

1977 Kind-Philipp-Leukämie-Preis

1978 Expeditionsarzt der 1. deutsch-französischen Mt.-Everest-Expedition

1978/79 Wehrpflichtiger Stabsarzt bei der Marine in Bremerhaven

1979 Promotion mit summa cum laude: "Zur molekularen Ätiologie der Myelofibrose im Kindesalter"

1980 Preis für den wissenschaftlichen Nachwuchs der J.W. Goethe-Universität Frankfurt für die Dissertation "Zur molekularen Ätiologie der Myelofibrose im Kindesalter"

Chirurgischer und wissenschaftlicher Werdegang:

1979–1982 BG Unfallklinik Frankfurt am Main

1982–1984 Chirurgische Klinik, Universität Lübeck

1984–1986 Allgemeinchirurgische Klinik, Zentralkrankenhaus St.-Jürgens-Straße Bremen

1986 Gebietsbezeichnung Chirurgie in Bremen

1986–1988 Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, Städt. Kliniken Fulda

1988 Teilgebiet Gefäßchirurgie in Hessen

1988–1990 Oberarzt, Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, Städt. Kliniken Fulda

1990–1991 Forschungsstipendium an der Harvard-University in Boston/USA

1991–1993 Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

1993 Teilgebiet Thorax- und Kardiovaskularchirurgie in Nordrhein-Westfalen

1993–1994 Oberarzt, Klinik für Herzchirurgie, Universitätsklinikum Charité, Humboldt-Universität Berlin

seit 1994 1. Oberarzt, Klinik für Herzchirurgie, Universitätsklinikum Charité, Humboldt-Universität Berlin

Arbeitsgebiete:

Herz-Assistsysteme, Kardiomyoplastie, Koronarchirurgie, Transplantationschirurgie

Forschungsgebiete:

Endothelzellforschung, Angiogenese, biologische Beschichtung synthetischer Oberflächen, Xeno-Transplantationen

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich, Dr. med. Horst Rudolf Laube, erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Rat der Medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach Herzchirurgie vorgelegte Habilitationsschrift mit dem Titel

"Aspekte der Angiogenese durch Angiogenin"

ohne fremde Hilfe verfaßt habe und keine anderen als die in der Habilitationsschrift angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Die Experimente und Modelle wurden eigenständig konzipiert und im Rahmen eines 15-monatigen Forschungsaufenthaltes an der Harvard University in Boston/USA am Center for Biochemical and Biophysical Sciences and Medicine im Labor von Prof. Dr. B. L. Vallee selbständig durchgeführt. Die beschriebenen Ergebnisse wurden eigenständig gewonnen. Die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Erlangung der Venia legendi eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Habilitation vorgelegt.

Berlin, den 7. März 1995